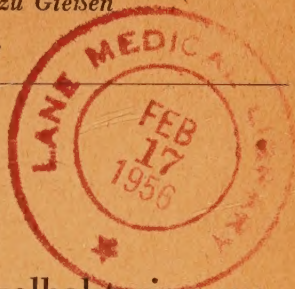


*Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen*

Direktor: Prof. Dr. H. Keller



Züchtungsversuche mit Tuberkelbakterien aus tierischem Organmaterial auf modifizierten Petraghani-Witte-Nährböden

INAUGURAL-DISSERTATION

*zur Erlangung des Doktor-Grades der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen*

Eingereicht von

RUDOLF PALATZKY

Tierarzt

aus Zaachtel/Sudetenland

Gießen 1955

Buchdruckerei Michael Laßleben Kallmünz über Regensburg

*Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen*

Direktor : Prof. Dr. H. Keller

Züchtungsversuche mit Tuberkelbakterien aus
tierischem Organmaterial auf modifizierten
Petragnani-Witte-Nährböden

INAUGURAL-DISSERTATION

*zur Erlangung des Doktor-Grades der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen*

Eingereicht von
RUDOLF PALATZKY
Tierarzt
aus Zauchtel/Sudetenland

Gießen 1955

Buchdruckerei Michael Laßleben Kallmünz über Regensburg

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Keller

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Keller

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 1955

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung	5
II. Schrifttum	6
III. Eigene Untersuchungen	16
A) Züchtung von Tuberkelbakterien aus tierischem Organ- material	16
a) Auftrag	16
b) Versuchsanordnung	16
c) Vorversuche	18
Versuchsreihe I	21
Versuchsreihe II	26
Versuchsreihe III	31
B) Die weitere Untersuchung des in den 3 Versuchsreihen erzielten Wachstums	37
a) mikroskopische Untersuchung	37
b) kulturelle Überprüfung auf Schrägagar	38
c) Tierversuche mit Meerschweinchen	38
IV. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	40
Schlußsätze	41
V. Literaturverzeichnis	42
VI. Lebenslauf	47



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0178

I. Einleitung

Die Übertragbarkeit der Tuberkulose wurde knapp vor hundert Jahren durch Villemin in Tierversuchen erwiesen, obwohl ihre Infektiosität schon vorher angenommen wurde. Als Erreger wurde ein „von außen an den Körper herantretendes Virus, ein Keim, der sich im Körper des Menschen und gewisser Tiere vermehren kann“, vermutet. Der eigentliche Erreger war noch unbekannt. Die Entdeckung der Tuberkelbakterien durch Robert Koch führte dann zur weiteren Erforschung dieser Krankheit, wobei er den Beweis erbrachte, daß die Tuberkulose mit dem von ihm entdeckten Tuberkelbazillus in ursächlichem Zusammenhang steht.

Die diagnostische Feststellung von Tuberkelbakterien erfolgt heute mittels der mikroskopischen Untersuchung, der Kultur und des Tierversuches. Infolge der Unsicherheit der mikroskopischen Methode bzw. infolge des hohen Kostenaufwandes und der langen Laufzeit, womit der Tierversuch einhergeht, steht zur Zeit der züchterische Nachweis der Tuberkelbakterien im Mittelpunkt der Bemühungen. Dieser ist heute nicht mehr schwierig, geht jedoch infolge des langsamen Wachstums, besonders der Rindervarietät mit erheblichen Zeitverlusten einher. Die Gründe des langsamen Wachstums liegen zur Hauptsache in der geringen Wachstumsintensität des Tuberkelbakteriums, aber auch der Typus, die verschiedene Resistenz und Virulenz, das Stadium des tuberkulösen Prozesses und die Stärke der Einsaat spielen dabei eine Rolle.

In Verbindung mit den Bestrebungen um eine optimale Kulturmethode soll in vorliegender Arbeit untersucht werden, ob durch den Zusatz bestimmter chemischer Substanzen zu dem in weiten Kreisen verwendeten Petagnani-Eiernährboden mod. nach Witte die Ergebnisse des Kulturversuches verbessert werden können.

II. Schrifttum

a) Der mikroskopische Nachweis

Der mikroskopische Nachweis der Tuberkelbakterien (TB) beruht auf ihrer Alkohol- und Säurefestigkeit, die durch den hohen Lipidgehalt bedingt ist (Kölbel (25)). Es gibt aber Übergänge von stark säurefesten Bakterien bis zum völligen Fehlen der Säurefestigkeit. Nach Steigner (49), Buss (4) und Kölbel (25) ist die Säurefestigkeit nicht immer vorhanden. Ehrlich (8) bezeichnet sie als vorübergehendes „ephemeres“ Stadium. Das Auftreten nicht säurefester TB im Organismus, besonders im Sputum, wird auf den TB-Stamm und dessen Beeinflussung durch die Abwehrkräfte des befallenen Organismus zurückgeführt. Das Auftreten nicht säurefester TB in der Kultur wird von verschiedenen Autoren angeführt; Kölbel (25) sieht den Grund dafür in der Vernachlässigung der Lipidsynthese bei Einzelbakterien, verursacht durch gesteigerte Vermehrungsgeschwindigkeit bei günstigen Kulturbedingungen oder dadurch, daß die Versorgung der Einzelbakterien bei Bildung kompakter Kolonien auf Schwierigkeiten stößt. Radetzky (41) beobachtet, daß von *Aspergillus niger* befallene TB-Kulturen ihre Säurefestigkeit eingebüßt haben.

Auf der Säurefestigkeit der TB beruhen die gebräuchlichen Färbemethoden. Robert Koch färbte die TB mit schwacher alkalischer Methylenblaulösung bei Zimmertemperatur während 24 Stunden. Ziehl ließ das Karbolmethylviolett eine Stunde lang einwirken; die lange Färbezeit wurde durch Erwärmen abgekürzt. Neelsen führte 1885 das Karbolfuchsin in die Färbung ein. Diese Methode, die im Aufkochen des überschichteten Farbstoffes auf dem Objektträger, in Entfärbung mit salzsaurem Alkohol und in Gegenfärbung mit Methylenblaulösung besteht, ist trotz der Hitzeschädigung der TB eine sehr gebräuchliche geblieben. Bei der Osol-Färbung wird mit Schwefelsäure entfärbt, hierauf folgt eine Behandlung mit Natriumsulfitlösung. TB, die geringe Säurefestigkeit aufweisen, werden durch die Säure entfärbt; sie enthalten aber noch Karbolfuchsin, das durch die Natriumsulfit-Behandlung wieder regeneriert wird, wodurch auch schwach säurefeste TB sichtbar gemacht werden können. Steigner (49) stellt die Kaltfärbung während 3—5 Stunden als in jedem Falle zuverlässig hin, ebenso auch noch die Färbung bei einer Temperatur von 56—60° während 15—30 Minuten; das Überschreiten von 80° C schädigt bereits die TB. Die von Buss (4) modifizierte ZNF (Ziehl-

Neelsen-Färbung) kommt diesen Forderungen in Bezug auf Temperatur nahe, indem der Ausstrich mit Aqua dest. überschichtet, kurz aufgekocht und dann erst eine kalte, doppelstarke Karbolfuchsinlösung zugegeben wird. Die Gegenfärbung erfolgt mit einer 0,2%igen Malachitgrünlösung. Die roten Stäbchen sind gut im grün gefärbten Organmaterial aufzufinden. Es sei noch die Fluoreszenz-Mikroskopie erwähnt, wobei die TB durch Fluorochromierung mit Auramin bei Bestrahlung mit ultravioletttem Licht zum Selbstleuchten gebracht werden. Die TB erscheinen goldgelb leuchtend auf dunklem Untergrunde. Nach Lämmle (27) und Meyn (31) führt dieses Verfahren besonders bei der Untersuchung von Körperausscheidungen zu mehr positiven Befunden als die ZNF.

Wie ersichtlich, liegt der große Vorteil der färberischen Darstellung der TB darin, daß die Methode einfach, rasch und ohne großen Aufwand an Mitteln durchzuführen ist. Leider haftet ihr aber der Nachteil an, daß in geringer Zahl vorhandene Tuberkelbakterien leicht der Feststellung entgehen. Auch die Anwendung des Anreicherungsverfahrens mit Antiformin, das nach Orzechowski (39) unersetzbar für die Mikroskopie ist, vermag nicht die Unsicherheit des mikroskopischen Nachweises so zu mindern, daß dieser mit der Kultur und dem Tierversuch in Konkurrenz treten könnte. Weiterhin ist es allen bisher erwähnten Färb-Verfahren nicht möglich, TB von anderen säurefesten Saprophyten mit Sicherheit zu unterscheiden.

b) Der Tierversuch

Die Vorteile des Tierversuches liegen im sicheren Anzeigen der Infektiosität des Untersuchungsmaterials. Hohn (15) gibt dem Tierversuch den Vorzug, soweit es sich um seröses Untersuchungsmaterial handelt. Meyn (34) empfiehlt die Prüfung im Tierversuch bei den von TB nicht zu unterscheidenden Wuchsformen apathogener Mykobakterien. Für tierische Ausscheidungen, wie Lungenschleim, Gebärmutter-schleim und Milch ist nach Seelemann und Klingmüller (46), Meyn (31), Söntgen (47), Wurzer (57) der Tierversuch als sicherer zu betrachten. Seine Schattenseiten sind die Langwierigkeit, die mit der Tierhaltung verbundenen Umstände und die Ausfälle durch interkurrente Todesfälle, die sich auf 10% (Hohn (15) 17%, (Beller (17) —30% Reuß (43) belaufen, so daß aus Sicherheitsgründen nie ein Versuchstier allein verwendet werden sollte. Die Sicherheit ist auch nur relativ und bleibt nach Buss und Lang (6) in „biologischen Grenzen“. Das geeignetste Versuchstier ist das Meerschweinchen. Gegenüber Viatschko (52), der für den syrischen Goldhamster eintritt, heben Reuss (43) und Wurzer (57) die größere TB-Empfänglichkeit und damit die bessere Eignung des Meerschweinchens hervor.

Bei den vergleichenden Untersuchungen von Nabholz und Beglinger (38) mit tuberkulösem Praxismaterial wurden durch den Goldhamster nur 58,2%, durch das Meerschweinchen aber 95,4% der positiven Proben erfaßt. Der Kaninchen-Tierversuch ist für die Zwecke der diagnostischen Routine-Untersuchung ungeeignet, da eine Infektion mit humanen Tuberkelbakterien bei diesem Tier nicht zum Haften kommt. Sein Wert ist auch bei der Typendifferenzierung umstritten. Besonders lehnt Beller (1) alle Typendifferenzierungsmethoden, die sich auf den Virulenzbegriff gründen, ab. Ein Nachteil des Meerschweinchenversuches liegt in der Apathogenität der Gallinaceus-Stämme für dieses Versuchstier. In Fällen, in denen der Tierversuch ein negatives Ergebnis bringt, wogegen Kultur oder Bakterioskopie TB nachweisen, (Beller (1), Viatschko (52), Buss und Lang (6), kann eine sog. „latente Infektion“ des Versuchstieres vorliegen. Beller konnte in mehreren Fällen aus unverdächtig aussehender Milz und Leber des Impflings TB nachweisen, letztere aus dem Kniefaltenlymphknoten infizierter, aber nicht offensichtlich tuberkulös erkrankter Meerschweinchen.

c) Der kulturelle Nachweis

Der kulturelle Nachweis ist leicht durchführbar und kommt in seiner diagnostischen Sicherheit dem Tierversuch nahe. (Trautwein (51), Beller (1), Meyn (33), Hohn (15). Das Vorhandensein von TB kann hier in den meisten Fällen früher als im Tierversuch festgestellt werden, wobei der Zeitaufwand und auch die Kosten wesentlich geringer sind. Die Sicherheit des mikroskopischen Ergebnisses wird erheblich übertroffen. Nach Trautwein (51) sprechen auch Gründe des Tierschutzes für weitestgehende Anwendung des Kulturverfahrens. Allerdings muß hier nach Meyn (34) und Wolters und Demel (53) einschränkend festgestellt werden, daß bei der kulturellen Untersuchung namentlich von Milch apathogene Mykobakterienarten auf dem üblichen Eiernährboden Wuchsformen bilden können, die von Tuberkelbakterien nicht zu unterscheiden sind. Eine genaue bakteriologische Prüfung ist in diesen Fällen unbedingt notwendig. Im Gegensatz zur großen Widerstandskraft der TB gegenüber chemischen Mitteln steht das langsame und anspruchsvolle Wachstum auf künstlichen Nährböden. Nicht zu Unrecht bezeichnet Gottsacker (10) den Tuberkulose-Erreger als ein Treibhausgewächs. Infolge seines langsamen Wachstums ist die Gefahr der Überwucherung durch Begleitkeime besonders groß. Diese Gründe sind es, denen beim Kulturverfahren Rechnung getragen werden muß. Die kulturelle Untersuchung von diagnostischem Material auf Tuberkelbakterien besteht demnach aus zwei Abschnitten: der Abtötung der Begleitkeime und der Züchtung auf Spezialnährböden.

1. Die Abtötung der Begleitkeime

Da das Untersuchungsmaterial meist mit Begleitkeimen verunreinigt ist, die schneller als die TB wachsen, ist eine Vorbehandlung unbedingt notwendig. Sie soll möglichst schonend für die oft nur in geringer Zahl vorhandenen TB sein und das Wachstum der Begleitkeime sicher unterdrücken.

Von chemischen Mitteln kommen Säuren, Laugen und freies Chlor abspaltende Präparate, wie Antiformin und Sputosol in Frage. Die Wirksamkeit gegenüber TB und den Begleitkeimen ist abhängig von

der Art des Mittels,
seiner Konzentration und
der Dauer seiner Einwirkung.

Zur Anreicherung der TB dient das Zentrifugieren.

Robert Koch (24) schaltete die Meerschweinchenpassage vor, um Reinkulturen zu bekommen. Aus der Milz des Impflings beimpfte er dann den Nährboden.

Das Säureverfahren zur Vorbehandlung führte Löwenstein (19) ein, nachdem er auf die hohe Widerstandsfähigkeit der TB gegen Säuren und Alkali hingewiesen hatte. Mit Sumiyoshi (29) versuchte er Schwefel-, Salz-, Essig- und Milchsäure in steigenden Konzentrationen für Sputumproben und fand die 15–20%ige Schwefelsäure als geeignet zur Abtötung der Begleitkeime, ohne daß bei einer Einwirkungszeit von 30 Minuten die TB wesentlich geschädigt wurden.

Von Surányi und Putnoky (50) wurde 25%ige Salzsäure neben Schwefelsäure gleicher Konzentration während 15 Minuten mit besserem Erfolg angewandt. Bei diesen früheren Verfahren wurde noch nach der Säurebehandlung der Bodensatz mit physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen, um die Einwirkung der Säure auf das Material zu unterbrechen; dabei wurden erneut Verunreinigungen beigebracht. Bei Salzsäure-Vorbehandlung wurden 96%, bei solcher mit Schwefelsäure 77% Reinkulturen aus mikroskopisch positiven Sputen erzielt. Eine längere Säurebehandlung als 15 Minuten ergab weniger Kolonien.

Das Verfahren nach Hohn (14), der 10vol%ige Schwefelsäure 20 Minuten einwirken ließ, dann 5 Minuten zentrifugierte und das saure Material unausgewaschen auf den von ihm entwickelten Eiernährboden brachte, bedeutete eine Arbeit- und Zeitersparnis bei der Vorbehandlung. Die Säure wird durch das Eiweiß im Nährboden gebunden. Er hebt die Schonung der TB bei höchstem Abtötungseffekt auf die Begleitkeime hervor und spricht sogar von einer Wachstumsförderung der TB durch die Schwefelsäure.

Daß die Schwefelsäure gegenüber der Salzsäure den besseren Abtötungseffekt zeigte, daß aber die TB auch in schwächerer Konzentration stärker angegriffen wurden bei 30 Minuten Einwirkungszeit,

stellten Seelemann und Klingmüller (46) fest. Salzsäure wurde in den Fällen bevorzugt, wo auf Grund des mikroskopischen Bildes mit schwachem TB-Gehalt zu rechnen war. Die 3,75 vol %ige Salzsäure wurde von ihnen allerdings als „TB-abschwächend, sogar abtötend“ bezeichnet. Hingegen sollte 1,25%ige Salzsäure für tuberkulöses Organmaterial zur völligen Abtötung der Begleitkeime wiederum nicht ausreichend sein. Von Wolters und Demel (57) wurde die 3,75 vol.%ige Salzsäure als optimale Konzentration, als nicht ausreichend die 2,5 volum%ige Salzsäure bei Sputum und Milchuntersuchungen bezeichnet. Die 10- und 20%ige Sulfosalicylsäure, die auch bei 60 minütiger Einwirkung keinen schädlichen Einfluß auf TB-Kulturen ausüben soll, empfahl Hohn (15) zur Vorbehandlung seröser Flüssigkeiten. Hermann (12) betrachtete das Uhlenhuth'sche Antiforminverfahren der Schwefelsäurevorbehandlung als überlegen wegen der Zerstörung des organischen Materials bei gleichzeitigem Abtötungseffekt auf die Begleitbakterien.

Nach Lichtenstein (27) hatte sich bei Vorbehandlung der Organe Tbc-kranker Tiere und von Sputen 10%ige = 2,5 vol %ige Salzsäure aufs „glänzendste bewährt“. Sie lehnte sowohl das Antiformin, wie auch die Schwefelsäure ab.

Die Vorbehandlung mit 15%igem Antiformin gegenüber der mit 10%iger Schwefelsäure verglich Orzechowski (36) auf Lubenau'schem Eiernährboden. Er gab bei Antiformin-Vorbehandlung einen hohen Prozentsatz (47%) von Verunreinigungen an. Auch stellte er, wie Hohn (14), die Wachstumsintensität der TB bei Schwefelsäurevorbehandlung als größer heraus, bei der er in 96% der Fälle positives Wachstum zu verzeichnen hatte, hingegen bei Antiformin-Vorbehandlung nur 39%. Mit 20%iger Sputosol-Lösung, die Ca-hypochlorit enthält und ähnlich dem Antiformin wirkt, wurde von Meyn (33) das Material von tuberkulösen Menschen, Rindern und Hühnern mit Erfolg vorbehandelt.

Ein Verfahren, bei dem eine Erwärmung des Materials der Säurebehandlung vorausgeht, wurde neuerdings von Breul (2) und Hedderich (11) in Anwendung gebracht. Durch die Wärmeeinwirkung wird eine Schwächung der Begleitkeime erzielt und eine geringere Säurekonzentration ermöglicht. Dieses „Wärme-Säure-Behandlungsverfahren“ hat sich bei der TB-Züchtung aus Milch gut bewährt. Nach Breul (2) wird die Milch auf 50° C während 5 Minuten erwärmt, 20 Minuten bei 2000 Touren zentrifugiert, die 1,5 vol%ige HCl 10 Minuten auf das aufgeführte Sediment einwirken gelassen, um anschließend 10 Minuten lang abzentrifugiert zu werden. Das Milchsediment, auf das die Salzsäure insgesamt 20 Minuten eingewirkt hat, wird un-
ausgewaschen auf Petagnani-Witte-Nährböden abgeimpft. Nach Hedderich wird auf 55° C erwärmt und mit 2 vol%iger Schwefelsäure

abgetötet. Die Kombination von Wärme und Säureeinwirkung und die hemmende Komponente des Malachitgrünzusatzes im Nährboden genügt, um das Wachstum der Begleitbakterien bei minimalster Schwächung der TB zu unterdrücken.

2. Die Züchtung auf Spezialnährböden

Die Tuberkelbakterien gedeihen am besten bei Körpertemperatur in Gegenwart von Sauerstoff. Ihr langsames Wachstum macht es erforderlich, daß durch organische und anorganische Zusätze zum Nährmedium ihre Wachstumsfreudigkeit gefördert und gleichzeitig ihre Unterdrückung durch schneller wachsende Begleitkeime verhindert wird. Zu ihrer Züchtung kommen eihaltige und eifreie Nährmedien, sowie Kombinationen von beiden in Anwendung. Der gewöhnliche Agar bildet für TB kein geeignetes Substrat. Auf Rinderserum, das durch mäßige Temperaturen zum Erstarren gebracht wurde, züchtete Robert Koch (24) die TB. Kartoffeln, am besten mit Glyzerinzusatz, wurden von Pawlowski (37) mit Erfolg verwendet. Das Glyzerin wurde von Nocard und Roux (37) eingeführt. Als hygroskopische Substanz wurde es zum Schutz gegen Oberflächenaustrocknung des starren Serums zugegeben; heute wird es insbesondere als Kohlenstoffquelle festen und flüssigen Nährböden zugefügt. Einem Großteil der bovinen Stämme ist es abträglich (Witte (55)). Seine Spaltung in intermediäre Säuren durch den humanen Typ wird im Bromkresolpurpurnährboden nach Wagener und Mitscherlich (53) zur Typendifferenzierung herangezogen.

Eierhaltige Nährböden.

Eine erhebliche Verbesserung für die Züchtung der TB stellen die aus Eiern oder mit Eizusatz bereiteten Nährmedien dar, auf denen die TB besonders schnell wachsen. Von Dorset und Lubenau (10) wurden Eier in Verbindung mit Glyzerinbouillon in die bakteriologische Technik eingeführt. Durch Zusätze wurden diese Eiernährböden weiter entwickelt.

Im Petragrani-Nährboden wird den TB außerdem noch Milch, Pepton, Kartoffelmehl und Kartoffel geboten. Als Hemmungsstoff gegen sekundäre Verunreinigungen wird nach der Empfehlung von Petragrani (32) und von Sonnenschein (46) Malachitgrün dem Nährboden beigelegt. Witte (23) modifiziert den Petragrani-Nährboden, indem er Fleischwasser, anstelle der halben Milchmenge, sowie Bohnenmehl zusetzt. Dehmel (23) läßt das Glyzerin weg; dadurch konnte der Wert dieses Nährbodens für die Kultur boviner Typen noch erhöht werden (Witte (25) Meyn (31)). Von allen zur TB-Züchtung empfohlenen Substraten wird der Petragrani-Nährboden von verschiedenen Autoren als das leistungsfähigste empfohlen. (Lichtenstein (28),

Wolters und Demel (57), Meyn (31), Beller (1). Besonders bei Salzsäurevorbehandlung genießt der Petragnani-Nährboden den Vorzug vor anderen eihaltigen Nährmedien (Wolters und Demel (57)).

Hohn (16) entwickelt die Nährbödensubstrate 1—4 aus dem Lubenau'schen Einährboden. In seinem Z-Einährboden erreicht er durch Hinzufügen von 3% Hämatinzusatz eine Wachstumsförderung der TB bezüglich Schnelligkeit des Erscheinens wie Zunahme der Koloniegroße. Der von ihm als „hämatinophil“ bezeichnete Typus bovinus soll bei Hämatinzusatz rascher wachsen und ebenso schnell wie der „glyzerinophile“ Typus humanus erscheinen. Das Glycerin übt bei Hämatiningehalt des Nährbodens keine wachstumshemmende Wirkung auf Bovinus aus. Zur Züchtung boviner Typen eignet sich auch sein Substrat 4, bestehend aus Kartoffelemulsion, Eiern und modifizierter Lockemannlösung mit Eisen- und erhöhtem Magnesiumsulfatgehalt. Er erwähnt dabei, daß dunkle Dotter vorteilhafter verwendet werden als blasse.

Gottsacker (12) erachtet das Eiklar nicht nur wertlos, sondern sogar schädlich, besonders für den bovinen Typ. Er bezeichnet als „Maximum der Kulturtüchtigkeit“ ein aus 50% Eigelb und 50% Sautonlösung bestehendes Nährmedium, auf dem Bovinus genau so rasch wie Humanus wächst. Bereits bei 20% Dotterzusatz ist diese Angleichung erreicht. Um einen von hemmenden Stoffen freien Nährboden zu erhalten, ersetzt er das Malachitgrün durch Benzopurpurin. Dieses gibt dem Nährboden einen rötlichen Schimmer, von dem sich die TB-Kolonien gut abheben. Sein lediglich zur Typendifferenzierung empfohlener Nährboden enthält noch 7,5% Fischauszug, wie 7,5% Hirnauszug mit Malachitgrün; doch die Kulturtüchtigkeit in bezug auf Wachstumsschnelligkeit steht hinter erstgenanntem zurück.

Der Bromkresolpurpurnährboden, von Wagener und Mitscherlich (53) zur Typendifferenzierung empfohlen, setzt sich aus Kartoffelgrundmasse, modifizierter Lockemannlösung und Dotter-Eimasse zusammen. Das als Indikator beigegebene Bromkresolpurpur zeigt die Säuerung des Nährbodens an, die von humanen TB durch Glycerinoxidation in eine intermediäre Säure bewirkt wird. Bei diesem Nährboden spielt das Asparagin weiterhin eine wichtige Rolle, das durch Spaltung durch den humanen Typ die zur Neutralisation wichtigen Ammoniumverbindungen liefert. Das Kaliumphosphat ist wegen seiner Pufferwirkung von Bedeutung.

Ein Vorteil der Einährböden beruht darauf, daß sie die mitaufgetragene Säure zu binden vermögen (Hohn (14), Schrader (45)), wobei das Eiweiß als Puffersubstanz wirkt und die schädigende Wirkung der Säure auf die Tuberkelbakterien mildert. Die Reaktion des Nährbodens ist dabei von wesentlichem Einfluß auf das Wachstum der TB. Jede alkalische Reaktion ist den TB abträglich (Hohn (15)).

Am günstigsten liegt das pH zwischen 6,5—7,0. Verunreinigungen durch Kokken und Stäbchen verschieben nach Herrmann W. (13) das pH bis unter 5, manche Pilze über 8. In beiden Fällen ist das Wachstum nicht mehr möglich, das bereits bei pH 6 aufhört. Das Malachitgrün im Nährboden kann dabei auch als Indikator angesehen werden (Wolters und Demel (57), das bei alkalischer Reaktion eine Verfärbung ins Gelbe zeigt, bei saurer Reaktion blaugrün verfärbt.

Die Erhaltung der Feuchtigkeit in festen eihaltigen Nährböden während der Koagulierung wie während der Bebrütung erachten Gottsacker (10) wie Hohn (15) genau so wichtig, wie die richtige Nährbodenzusammensetzung. Die Tuberkelbakterien sind gegen Austrocknung sehr empfindlich. Dies zeigt die gehemmte Kolonieentwicklung im oberen Teil des Röhrchens. Lubenau (10) schlägt vor, wassergefüllte offene Schalen mit den Eiröhrchen in den Erstarrungsapparat zu stellen. Hohn (15) empfiehlt den Zusatz natursaurer Fleischbrühe, Gottsacker (10) Sautonzusatz zum Petragrani-Nährboden. Lichtenstein (27) erachtete schon früher die reichliche Bildung von Kondenswasser in Petragraniröhrchen als genügend. Zum Schutz gegen Austrocknung während der langen Bebrütungszeit ist ein Verschuß der Röhrchen notwendig. Paraffinierte Zellstoffpfropfen sind von Hohn (17) und Schrader (25) als einfach und zweckentsprechend angegeben, die genug Sauerstoff für das TB-Wachstum durchlassen. Die Kapsenberg-Aluminiumkappen verwenden Hohn wie Gottsacker. Die bei Feuchtigkeit erhöhte Schimmelgefahr ist durch Abflammen der Röhrchen und Stopfen behebbar. (Gottsacker (10).

Verunreinigungen des Nährbodens können durch geeignete Vorbehandlung und durch Zusatz von Hemmungsstoffen zum Nährboden weitgehend ausgeschaltet werden. 47% Verunreinigungen bei Antiforminvorbehandlung gibt Orzechowski (39) auf Eiernährboden an. Wolters und Demel (56) hatten bei humanen Sputen 10%, bei Rindersputen sogar 73% Verunreinigungen, wobei die Salzsäurevorbehandlung nicht völlig ausreichte. Auf den Malachitgrünzusatz des Petragrani-Nährbodens führen sie die weitgehendste Ausschaltung von Begleitbakterien zurück; Hohn (16) gibt auf seinen Z-Einährboden die Verunreinigungen mit 7,8% an, durch Malachitgrünzusatz sanken sie auf 1,5%. Er gibt als Verunreinigungsquote der unbeimpften malachitgrünfreien Röhrchen 6,3% an. In flüssigen Substraten läßt sich nach Hermann (14) durch geringere (1:50 000) Malachitgrünkonzentration die Zahl der sekundären Verunreinigungen auf 4—5% herabmindern. Brodhage (3) nennt neuerdings bei 1000 Vergleichen die Verunreinigungsquote auf Dubos-Agar von 9,3% gegenüber Hohn'schen Eiernährböden von 14,6%.

Die Wachstumszeit auf Eiernährboden beträgt für Humanus 10 Tage nach Hohn (14) und Schrader (45); für Bovinus geben Seele-

mann und Klingmüller (46) 30—56 Tage an, für Gallinaceus 8 Tage. Auf Petraghani-Nährböden erzielt Lichtenstein (28) aus Sputen und Organen nach 8—31 Tagen, Wolters und Demel (56) aus Sputen und Milch frühestens nach 12, im Durchschnitt nach 18 Tagen Wachstum. Bovinus wuchs nicht vor dem 14. Tag. Eine Angleichung des Wachstums von Bovinus an Humanus ist auf Hohn'schen Z-Einährböden wie auf Gottsackers Eigelb-Sauton-Nährboden festzustellen. Hohn (16) gibt 16—17 Tage an, Gottsacker (10) frühestens den 8. Tag. 4—5 Tage sind in Einzelfällen für Humanus von ihm angeführt. Die flüssigen eifreien Nährmedien zeigen ein früheres Angehen der Kulturen, wie Meyn (33) in Vergleichen von Herrmann-Substrat 30 zu Petraghani-Nährboden zeigt. So wächst Bovinus im Durchschnitt schon nach 9, Humanus nach 8 und Gallinaceus nach 7 Tagen. Die kulturelle Typendifferenzierung wird auf verschiedenen Nährböden, wobei eihaltige feste Nährsubstrate bevorzugt werden, vorgenommen. Den Petraghani-Nährboden bezeichnen Wolters und Demel (57) wie auch Meyn (31) zur Unterscheidung der 3 Typen als geeignet. Auf Grund des vielgestaltigen Wachstums ist es möglich, die Abgrenzung humaner und boviner Stämme vorzunehmen und charakteristische Unterschiede gegenüber Gallinaceus-Stämmen zu erkennen. Der schneller wachsende, leichter züchtbare, üppiges, trockenkrümeliges Wachstum zeigende und Blumenkohlformen bildende Typus humanus zeigt Wachstum vom 12. Tage an, hingegen ist der dysgonische Typus bovinus langsamer wachsend, zeigt zartes, bleiches, feuchtglänzendes Wachstum, spätere Grünfärbung und Wachstum nicht vor dem 14. Tage. Die Mehrzahl der Stämme wächst auf glyzerinhaltigem Nährboden schlechter. Der anspruchslosere aviäre Typ ist leichter zur Entwicklung zu bringen, zeigt feuchtschleimiges Wachstum mit Erhebungen und manchmal Gelbfärbung der Kultur und wächst schon vom 10. Tage an. Meyn (31) erwähnt auch noch die spätere Ringbildung. Hohn (16) verwendet seinen ähnlich zusammengesetzten Z-Einährboden zur Unterscheidung und findet den bovinen Typ als flachen, feuchtglänzenden, runden Rasen, der nach 3 Wochen erscheint. Auf dem von Gottsacker (10) speziell zur Typendifferenzierung entwickelten Fisch- und Hirnauzug enthaltenden Eigelb-Sauton-Nährboden lassen sich ähnliche Typenunterschiede erkennen, die erst nach 4 Wochen voll ausgebildet sind und bei mäßiger Beimpfung am besten zum Ausdruck kommen. Wagener und Mitscherlich (53) verwenden den Dubos-Agar, auf dem alle drei Typen wachsen, zur Unterscheidung des aviären Typs gegenüber den Säugertypen. Letztere sind nicht unterscheidbar. Ferner bringen sie in Anwendung den aus Salzlösungen, Glukose, dem Sojabohnenpräparat „Solaktin“, Agar-Agar und Glycerin zusammengesetzten Solaktin-Nährboden, auf dem nur Gallinaceus gedeiht. Auf ihrem Bromkresolpurpur-Nährboden kann eine

Unterscheidung der Säugertypen vorgenommen werden. Der humane Typ führt einen Farbumschlag des Bromkresolpurpurs durch Säurebildung aus Glycerin herbei. Später geht diese Gelbfärbung wieder zurück. Der bovine Typ zeigt keine Veränderung des blauen Nährbodenindikators. Von den flüssigen Nährmedien verwenden sie das glyzerinhaltige Herrmann'sche Substrat 30, auf dem nur Humanus in 60% der Fälle ein Oberflächenhäutchen bildet. In Besredkabouillon bilden nach Wolters und Demel (57) die beiden Säugertuberkelbakterientypen einen krümeligen Bodensatz ohne Trübung der Nährflüssigkeit, die Vogeltuberkelbakterien dagegen einen schleimigen Zopf.

Die apathogenen Mykobakterien können auf Eiernährböden Wuchsformen bilden, die von TB-Kolonien kaum zu unterscheiden sind. (Meyn (34)). Sie bilden glatte, feuchtglänzende, erhabene, flache und blumenkohlartige Formen, ihre Farbe schwankt zwischen weiß-gelb-orange- bis ziegelrot, sie wachsen meistens schneller als die TB, bereits in 1 bis 2 Tagen und sind anspruchsloser hinsichtlich des Nährbodens. Durch das frühe Wachstum wie auch durch Wuchs und Farbe können sie meist von den TB-Kolonien unterschieden werden (Wolters und Demel (56)). Allerdings gibt es auch seltener vorkommende, anspruchsvollere Stämme, die nur auf Einährböden langsam wachsen und TB-ähnliche Kolonien bilden können. (Meyn (34)). Deshalb ist die Prüfung auf gewöhnlichen Nährböden, besonders aber im Tierversuch notwendig.

III. Eigene Untersuchungen

A) Züchtung von Tuberkelbakterien aus tierischem Organmaterial

a) Untersuchungsauftrag

Von Herrn Professor Dr. H. Keller wurde mir aufgetragen, zu untersuchen, ob sich durch Zugabe eines Glycerin-Schwefelsäure-Esters zum Petraghani-Witte-Nährboden die Wachstumsfreudigkeit der Tuberkelbakterien steigern läßt, worauf einige Beobachtungen aus dem Institut hindeuteten. Weiter sollte festgestellt werden, ob zur Wärme-Säure-Vorbehandlung die Salz- oder Schwefelsäure bei dem Versuchsnährboden sich vorteilhafter verwenden läßt. Das erzielte Wachstum sollte dabei mikroskopisch, durch Überimpfung auf Schrägagar und im Tierversuch überprüft werden.

b) Versuchsanordnung

Das tuberkulöse Organmaterial wurde fein zerschnitten und im Porzellan-Mörser mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben bis zur Bildung eines Breies. Dieser wurde mit physiologischer NaCl-Lösung auf ca. 10 ccm aufgefüllt. Die Aufschwemmung der Verreibung wurde durch Gaze filtriert und anschließend 20 Minuten bei 2000 Touren zentrifugiert.

Aus dem Sediment wurden 2 Objektträgerausstriche angefertigt, nach Ziehl-Neelsen (ZNF) und ihrer Modifikation nach Buss gefärbt und auf Tuberkelbakterien untersucht. Die ZNF wurde nach der in Klimmer und Schönberg (23) angegebenen Vorschrift ausgeführt, die modifizierte ZNF nach Buss (4) in folgender Weise:

Das lufttrockene, hitzefixierte Präparat wurde mit Aqua dest. übergossen und bis zur Bläschenbildung erhitzt. Hierauf wurde „doppelstarke“ Karbolfuchsinlösung (20 ccm gesättigte alkohol. Fuchsinlösung, 5 ccm Phenol. liquefact., 75 ccm Aqua dest.) in gleicher Menge zugegossen und 2 Minuten einwirken gelassen, dann mit Salzsäurealkohol entfärbt, wassergespült und mit 2 promilliger Malachitgrünlösung 15 sec. nachgefärbt.

Zur Abtötung der Begleitkeime wurden auf 50° C erwärmte 1,5 vol%ige Salzsäure, bezw. auf 55° C erwärmte 2 vol%ige Schwefelsäure dem Sediment zugesetzt und dieses mit einer Öse in der Säure gleichmäßig verteilt. Nach 10-minütiger Säureeinwirkung wurde abermals 10 Mi-

beim Zugesezt und dieses mit einer Use in der Säure gleichmäßig verteilt. Nach 10-minütiger Säureeinwirkung wurde abermals 10 Mi-

nuten zentrifugiert, so daß die Säure insgesamt 20 Minuten wirksam war. Nach dem Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Bodensatz sofort mit einer ausgeglühten Drahtöse auf den Nährboden verimpft. Es wurden stets 2 Ösen Bodensatz auf jedes Nährboden-Röhrchen übertragen und je Fall jeweils 3 Röhrchen beimpft. Ihre Kontrolle fand täglich statt. Nach dem Ergebnis der Versuche wurde für die Hauptversuche die Abtötung der Begleitbakterien nur noch mit 1,5 vol%iger Salzsäure vorgenommen.

Die Herstellung der Petraghani-Nährböden in der Modifikation nach Witte erfolgte im Institut; ihre Zusammensetzung ist folgende:

10,0 ccm	Liebigs Fleischextrakt
5,0 g	Kochsalz
1000,0 ccm	Leitungswasser
150,0 ccm	frische Kuhmilch
12,0 g	Bohnenmehl
2,0	Pepton
2	eigroße Kartoffeln (180 g)
8	Eier
2	Eigelb
(24,0 ccm	Glyzerin)
20,0 ccm	2%iges Malachitgrün.

Zu 100 ccm der glyzerinfreien Nährbodenmasse wurde 1 ccm Ester zugesetzt. Der Ester wurde aus 10 ccm Glyzerin und 1,0 bzw. 0,5 ccm Schwefelsäure (mit spezifischem Gewicht 1,822) bereitet und eine Woche im Brutschrank bei 37° C reifen gelassen. Das pH des Nährbodens wurde mit 10%iger Sodalösung jeweils auf 6,7—6,9 eingestellt.

Weiterhin wurde auch noch ein Petraghani-Witte-Eiernährboden versucht, bei dem neben 0,5 ccm Glyzerin-Schwefelsäure-Ester auch noch 0,07 g Dikaliumphosphat zu 100 ccm Nährbodenmasse zugesetzt wurde.

Zur Pathogenitätsprüfung der gewachsenen TB-Kolonien wurden 28 Fälle an 31 Meerschweinchen verimpft. Die ausgewählten Kolonien stammten nur von den modifizierten Versuchsnährböden. Ihre Auswahl erfolgte nach Wuchsform, Nichtsäurefestigkeit und besonders frühem Wachstum.

Die ausgewählten Kulturen wurden unter sterilen Kautelen abgenommen und in 3 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung gut verteilt. Von dieser Suspension wurde je 1 ccm in die rechte Kniefalte eines Meerschweinchens injiziert. Die Tiere wurden nach 6 Wochen getötet.

Erklärung

der in den Tabellen gebrauchten Zeichen und Abkürzungen.

—	=	kein Wachstum
(+)	=	1—10 Einzelkolonien
+	=	11—30 Einzelkolonien
++	=	31—100 Einzelkolonien
+++	=	über 100, jedoch noch Einzelkolonien
EK	=	Einzelkolonien
R	=	Rasenbildung (Die Zahlen hinter R bedeuten jeweils den Tag, an dem erstens die Rasenbildung beobachtet wurde).
V	=	Verunreinigung des Nährbodens durch Bakterienwachstum.
P	=	Verunreinigungen durch Pilzbefall.
Tv	=	Tierversuch.
A	=	Alkohol- und säurefeste Stäbchen.
N	=	Nicht alkohol- und säurefeste Stäbchen.

c) Vorversuche

(siehe Tabelle 1, zwischen S. 16 und 17)

Um die bessere Eignung der niedrigprozentigen Salz- oder Schwefelsäure zur Vorbehandlung des Kulturmaterials bei Verwendung des im Versuch stehenden Nährbodens zu erproben, wurde zunächst eine Vorversuchsreihe mit 10 Fällen angesetzt.

Material: Tuberkulöses Organmaterial von Rindern und Schweinen.

Vorbehandlung:

- a) 1,5 vol%ige Salzsäure auf 50° C erwärmt
20 minütige Einwirkung.
- b) 2 vol%ige Schwefelsäure auf 55° C erwärmt
20 minütige Einwirkung.

Nährböden: Petraghini-Witte mit Glyzerin-Schwefelsäure-Ester-Zusatz
(1 ccm Ester auf 100 ccm Nährbodenmasse).

Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche

1. Vergleich der Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung und der Kulturversuche

Für die mikroskopische Untersuchung der Organverreibungen wurden nach dem Zentrifugieren vor der Säurebehandlung aus dem Bodensatz jeweils 2 Objektträgerausstriche gemacht und nach Ziehl-Neelsen bzw. der Modifikation nach Buss gefärbt. Bei Beachtung beider Methoden wurde das verwendete Ausgangsmaterial für die Kulturversuche

5 mal mikroskopisch positiv = 50% und

5 mal mikroskopisch negativ = 50% befunden,

wobei die Kultur in 9 Versuchen = 90% Tuberkelbakterien nachgewiesen hat. In dem kulturell negativen Versuch sind auch mikroskopisch keine TB gefunden worden; das Material war ein verkäster und verkalkter Mediastinallymphknoten vom Rind.

2. Vergleichende Gegenüberstellung der Kultur- ergebnisse

a) Das Wachstum überhaupt

Von den 10 Versuchen sind jeweils 3 Röhrchen nach Wärme-Säurevorbehandlung mit Schwefel- und Salzsäure beimpft worden. Hierbei zeigte sich TB-Wachstum nach Vorbehandlung mit

Salzsäure in 9 Versuchen = 90%

Schwefelsäure in 7 Versuchen = 70%

Bei je 30 verglichenen Röhrchen zeigt sich TB-Wachstum nach Vorbehandlung mit

Salzsäure in 24 Röhrchen = 80%

Schwefelsäure in 13 Röhrchen = 43,3%

Bei Salzsäurevorbehandlung zeigen 36,7% mehr Röhrchen Wachstum als bei Schwefelsäurevorbehandlung.

b) Wachstumsbeginn

Das TB-Wachstum wurde sichtbar bei Vorbehandlung mit

Salzsäure zwischen 6. und 10. Tag

Schwefelsäure zwischen 6. und 25. Tag.

Das Durchschnittswachstum ist bei Vorbehandlung mit Salzsäure um 8,3 Tage kürzer als bei solcher mit Schwefelsäure. Es beträgt bei 30 Röhrchen bei Vorbehandlung mit

Salzsäure 7 Tage

Schwefelsäure 15,3 Tage.

Das früheste Wachstum dieser Versuchsreihe ist bei beiden Vorbehandlungsmethoden am 6. Tag beobachtet worden. In 5 Versuchen trat Wachstum bei Salzsäurebehandlung bereits am 6. Tage auf; bei den entsprechenden Schwefelsäureversuchen einmal am 6., einmal am 8., zweimal am 25. Tag und einmal kein Wachstum.

Am 7. Tage trat bei Salzsäurevorbehandlung zweimal Wachstum auf, bei den entsprechenden Schwefelsäureversuchen einmal am 10. und einmal am 18. Tag. Am 8. Tag erschienen bei Salzsäurebehandlung einmal Kolonien, bei gleichem Schwefelsäureversuch erst am 16. Tag.

Am 9. Tag zeigt sich bei Salzsäurevorbehandlung einmal Wachstum, der Schwefelsäureversuch ging nicht an.

Kein Wachstum ist in einem Versuch (Nr. 4) bei beiden Vorbehandlungsmethoden festzustellen. Der mikroskopische Befund des verkästen und verkalkten Rinderlymphknoten war ebenfalls negativ.

Kein Wachstum bei der Untersuchung von 10 Fällen wurde festgestellt bei Vorbehandlung

mit Salzsäure	in 1 Fall	= 10%
mit Schwefelsäure	in 3 Fällen	= 30%

Kein Wachstum bei 30 Röhrchen wurde festgestellt bei Vorbehandlung

mit Salzsäure	in 6 Röhrchen	= 20%
mit Schwefelsäure	in 17 Röhrchen	= 56,6%

c) Verunreinigungen

sind bei beiden Vorbehandlungsmethoden nicht aufgetreten.

d) Wachstumsstärke

Eine Übersicht über die Anzahl der gewachsenen Kolonien gibt die Tabelle 1, sowie die nachstehende Aufstellung über die Wachstumsstärke in der Vorversuchsreihe.

Tabelle 1a

Wachstumsstärke	Vorbehandlung mit	
	1,5 vol%iger Salzsäure	2 vol%iger Schwefelsäure
(+) 1—10 Einzelkolonien	8 mal	11 mal
+ 11—30 Einzelkolonien	11 mal	2 mal
++ 31—100 Einzelkolonien	— mal	— mal
+++ Über 100, jedoch noch Einzelkolonien	2 mal	— mal
R Rasen allein	— mal	— mal
Rasen und Einzelkolonien	3 mal	— mal
Bewachsene Röhrchen insgesamt	24	13

In der Größe der Kolonien ließen sich keine Unterschiede herausfinden. Die Kolonieförmigkeiten ließen blumenkohl-, perlen- und brustwarzenähnliche Gebilde erkennen und zeigen keine Unterschiede in den entsprechenden Vergleichsröhrchen. Rasenbildung ist in einem Versuch (Nr. 3) nach Salzsäurebehandlung am 14. Tag in Erscheinung getreten, nachdem am 9. und 10. Tag Einzelkolonien bereits erschienen waren. Ursprungsmaterial war dazu ein Jejunallymphknoten vom Schwein. Die entsprechenden Schwefelsäure-Vorbehandlungs-Röhrchen wiesen überhaupt kein Wachstum auf.

Aus der Vorversuchsreihe geht hervor, daß bei Salzsäurevorbehandlung das Wachstum früher auftritt und mehr Kolonien angehen. Daher wurde bei den weiteren Versuchen nur noch Salzsäure zur Vorbehandlung des Materials verwendet.

d) Hauptversuche

Versuchsreihe I

(siehe Tabelle 2, zwischen S. 24 und 25)

Ziel ist, zu versuchen, durch Glyzerin-Schwefelsäure-Ester-Zusatz zum Petraghani-Witte-Nährboden die Wachstumsfreudigkeit der TB anzuregen, um dadurch im Vergleich zum glyzerinfreien und glyzerinhaltigen Petraghani-Witte-Nährboden ein früheres Sichtbarwerden von TB-Kolonien zu erreichen.

Material: 40 Fälle tuberkulöses Organmaterial von Rindern, Schweinen und tuberkelbakterienhaltige Kuhmilch.

Vorbehandlung: 1,5 vol%ige Salzsäure auf 50° C erwärmt, bei 20-minütiger Einwirkung.

Nährböden: Je Versuch wurden je 3 Röhrchen der nachstehend aufgeführten Nährböden beimpft:

1. Petraghani-Witte
mit Glyzerin-Schwefelsäure-Ester Zusatz 10:1
(1 ccm Ester auf 100 ccm Nährbodenmasse)
2. Petraghani-Witte
mit Glyzerin
3. Petraghani-Witte
mit Glyzerin

Zusammenfassung der Versuchsreihe I

1. Vergleich der Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung und der Kulturversuche

Bei Ausführung beider Färbemethoden wurde das verwendete Ausgangsmaterial für die Kulturversuche

26 mal mikroskopisch positiv = 65% und

14 mal mikroskopisch negativ = 35% befunden,

wobei durch die Kultur in allen 40 Fällen = 100% Tuberkelbakterien nachgewiesen werden konnten.

2. Vergleichende Gegenüberstellung der Kultur- ergebnisse

a) Das Wachstum überhaupt

Von den 40 Fällen sind jeweils für die 3 zu vergleichenden Nährbodenarten je 3 Röhrchen beimpft worden.

Es zeigte sich, daß

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz 10:1 in 39 Versuchen = 97,5%

auf P.-W. mit Glyzerin in 40 Versuchen = 100 %

auf P.-W. ohne Glyzerin in 39 Versuchen = 97,5%

TB-Wachstum auftrat.

Bei je 120 verglichenen Röhrchen verschiebt sich das Bild und zeigt, daß

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz 10:1 in 93 Röhrchen = 77,5%

auf P.-W. mit Glyzerin in 108 Röhrchen = 90 %

auf P.-W. ohne Glyzerin in 93 Röhrchen = 77,5%

TB-Wachstum erschien.

Der glyzerinhaltige Petraghani-Witte-Nährboden steht somit voran mit 12,5% mehr bewachsenen Röhrchen als bei dem modifizierten Petraghani-Witte-Ester-Nährboden und dem glyzerinfreien Petraghani-Witte-Nährboden, die beide die gleichen Ergebnisse zeigten.

b) Wachstumsbeginn

Dieser ist nach Versuchsreihen und Röhrchen geordnet in nachstehenden 2 Übersichten dargestellt.

Tabelle 2a

Vergleichende Gegenüberstellung des ersten Wachstums bei den Fällen der Versuchsreihe I

Erstes Wachstum	Petr.-W. + Ester 10:1	Petr.-W. mit Glycerin	Petr.-W. ohne Glycerin
nach 4 Tagen	—	—	—
nach 5 Tagen	2	9	3
nach 6 Tagen	13	13	6
nach 7 Tagen	3	14	14
nach 8 Tagen	11	2	3
nach 9 Tagen	5	—	—
nach 10 Tagen	1	—	3
nach 11—15 Tagen	4	2	9
nach 16—20 Tagen	—	—	—
nach 20—25 Tagen	—	—	—
nach 26—30 Tagen	—	—	—
nach 31—35 Tagen	—	—	1
Insgesamt sind angegangen	39	40	39
Kein Wachstum	1	0	1
Durch Verunreinigungen ausgefallen:			
Pilzbefall:	—	—	—
Bakterielle Verunreinigung:	—	—	—
	40 Fälle	40 Fälle	40 Fälle

Tabelle 2b

Vergleichende Gegenüberstellung des ersten Wachstums bei den Röhrchen der Versuchsreihe I

Erstes Wachstum	Petr.-W. + Ester 10:1	Petr.-W. mit Glycerin	Petr.-W. ohne Glycerin
nach 4 Tagen	—	—	—
nach 5 Tagen	2	9	5
nach 6 Tagen	32	28	11
nach 7 Tagen	5	36	28
nach 8 Tagen	29	24	18
nach 9 Tagen	12	1	3
nach 10 Tagen	5	4	5

nach 11—15 Tagen	6	6	21
nach 16—20 Tagen	1	—	—
nach 21—25 Tagen	1	—	—
nach 26—30 Tagen	—	—	1
nach 31—35 Tagen	—	—	1
Insgesamt sind angegangen:	93	108	93
Kein Wachstum	24	12	27
Durch Verunreinigungen ausgefallen:			
Pilzbefall:	3	—	—
Bakterielle Verunreinigungen:	—	—	—
	120	120	120
	Röhrchen	Röhrchen	Röhrchen

Im Durchschnitt trat das erste Wachstum auf den Versuchs-Nährböden nach 7,9 Tagen, auf P.-W. mit Glycerin nach 7,2 Tagen und auf den P.-W. ohne Glycerin nach 8,8 Tagen auf. In Bezug auf das erste Wachstum hat sich somit der glyzerinhaltige P.-W. am besten bewährt.

Kein Wachstum auf allen 3 Nährböden zugleich ist in keinem Fall festgestellt worden.

Kein Wachstum bei 40 Versuchen wurde beobachtet

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz 10:1	in 1 Versuch =	2,5%
auf P.-W. mit Glycerin	in 0 Versuch =	0,0%
auf P.-W. ohne Glycerin	in 1 Versuch =	2,5%

Kein Wachstum bei je 120 Röhrchen konnte festgestellt werden

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz 10:1	in 24 Röhrchen =	20 %
auf P.-W. mit Glycerin	in 12 Röhrchen =	10 %
auf P.-W. ohne Glycerin	in 27 Röhrchen =	22,5%

Die geringste Zahl unbewachsener Röhrchen zeigt der glyzerinhaltige P.-W.-Nährboden.

c) Verunreinigungen

Von den 40 Versuchen fiel kein Versuch durch bakterielle Verunreinigung oder Schimmelpilzbefall ganz aus.

Verunreinigungen bei je 120 Röhrchen durch Schimmelpilzbefall zeigten sich:

auf modif. P.-W. mit Glycerin-Schwefelsäure-Ester 10:1	in 3 Röhrchen =	2,5%
auf P.-W. mit Glycerin	in 0 Röhrchen =	0,0%
auf P.-W. ohne Glycerin	in 0 Röhrchen =	0,0%

Der modifizierte 10:1 Ester-P.-W. ist laut vorstehendem Vergleich anfälliger für Schimmelpilzbefall als die gewöhnlichen Vergleichs-Petragnani-Witte-Nährböden.

d) Wachstumsstärke

Eine Übersicht über die Anzahl der gewachsenen Kolonien gibt die Tabelle 2 und die nachstehende Aufstellung über Wachstumsstärke in der Versuchsreihe I.

Tabelle 2c

Wachstumsstärke	Petr.-Witte + Ester 10:1	Petr.-Witte mit Glyzerin	Petr.-Witte ohne Glyzerin
(+) 1—10 Einzelkolonien	46 mal	75 mal	52 mal
+ 11—30 Einzelkolonien	33 mal	26 mal	23 mal
++ 31—100 Einzelkolonien	2 mal	3 mal	1 mal
+++ Über 100, jedoch noch Einzelkolonien	3 mal	2 mal	— mal
R Rasen allein	— mal	— mal	— mal
Rasen und Einzelkolonien	9 mal	2 mal	17 mal
Bewachsene Röhrrchen insgesamt	93	108	93

Hinsichtlich der Größe der Kolonien ist aufgefallen, daß die üppigsten Einzelkolonien auf dem Ester-P.-W.-Nährboden zur Entwicklung kamen. Die Kolonien zeigten runzelig trockene, bröcklige Sandhaufenformen, blumenkohlähnliche Bildungen, auch feuchtglänzende brustwarzenähnliche, perlen- und knopfartige Gebilde wie schmierige Rasenformen und waren nach 4—6 Tagen beträchtlich größer als die auf den Petragnani-Vergleichsnährböden. Eine stärkere Pigmentierung von gelbbraun bis annähernd kaffeebraun zeigten besonders die sandhaufenförmigen und blumenkohlähnlichen Kolonien auf dem esterhaltigen Nährboden. Besonders auffällig in bezug auf Größe und Pigmentierung waren die Kolonien der Versuche Nr. 20 und Nr. 50; im ersteren wuchsen auf dem Ester-Petragnani auf zwei Röhrrchen über 10 blumenkohlartige gelbliche Kolonien von ca. 5 mm Durchmesser, während auf den beiden Vergleichs-P.-W.-Nährböden dieselben Formen sich bildeten, aber knapp die halbe Größe erreichten und blaß-weißlich blieben. In letzterem Falle (Nr. 50) wuchsen 20—25 bräunliche warzige Kolonien auf dem Ester-P.-W., während auf den gewöhnlichen

P.-W.-Vergleichsnährböden nur die Hälfte dieser Zahl und zwar Kolonien von spärlichem Wuchse und blasser Farbe sich zeigten. In beiden Fällen stammte das Ausgangsmaterial von Rindern.

Rasenbildung zeigte sich, nachdem vorher schon Einzelkolonien aufgetreten waren.

Sie trat in 4 Versuchen auf Ester-P.-W.

in 1 Versuch auf glyzerinhaltigem und

in 7 Versuchen auf glyzerinfreiem P.-W.

auf.

Der Rasen erschien allgemein zwischen dem 18. und 20. Tag; auf dem Versuchsnährboden einmal schon am 15. Tag.

Das Material stammte in allen 7 Fällen von Rindern.

Aus den Vergleichen über die Wachstumsstärke ist zu ersehen, daß auf esterhaltigem P.-W. mehr Kolonien zur Entwicklung kommen, sowie, daß hier eine bessere Größenentwicklung und stärkere Pigmentierung bewirkt wird.

Versuchsreihe II

(siehe Tabelle 3, zwischen S. 28 und 29)

Ziel dieser Versuchsreihe war, durch Verwendung von Nährböden, die mit der halben Menge des Esters zubereitet wurden, wobei bei der Herstellung des Esters die Schwefelsäuremenge ebenfalls auf die Hälfte verringert worden war, eine mildere Wirkung auf die TB auszuüben. — Es wurden hier zwei Versuchsnährböden einander gegenübergestellt: Ein Petragnani-Witte-Nährboden, dem auf 100 ccm Nährbodenmasse 0,5 ccm Ester und ein solcher, dem neben dem Ester zur Pufferung noch Dikaliumphosphat beigegeben worden war.

Material: 30 Fälle tuberkulöses Organmaterial von Rindern, Schweinen, Meerschweinchen, tuberkelbakterienhaltige Kuhmilch.

Dorbehandlung: 1,5 vol%ige Salzsäure auf 50° C erwärmt bei 20-minütiger Einwirkung.

Nährboden:

1. Petragnani-Witte

mit Glyzerin-Schwefelsäure-Ester 10:0,5)

(0,5 ccm Ester auf 100 ccm Nährbodenmasse)

2. Petragnani-Witte

mit Glyzerin-Schwefelsäure-Esterzusatz 10:0,5

und Dikaliumphosphat

0,07 g K_2HPO_4 auf 100 ccm Nährbodenmasse.

Zusammenfassung der Versuchsreihe II

1. Vergleich der Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung und der Kulturversuche

Bei Ausführung beider Färbemethoden wurde das verwendete Material

25 mal mikroskopisch positiv = 83,3% und

5 mal mikroskopisch negativ = 16,6% befunden,

wohingegen die Kulturversuche in 28 Versuchen = 93,3% ein positives Ergebnis brachten.

In beiden negativen Kulturversuchen sind alkohol- und säurefeste Stäbchen mikroskopisch gefunden worden. Nachdem im Versuch 64 auf keinem Röhrchen Wachstum auftrat, dürfte hierfür die Erklärung darin zu finden sein, daß die TB bereits abgestorben waren. Im Versuch 78 konnten infolge Überwucherung aller Nährbodenröhrchen mit Kokkenrasen am 3. Tage TB-Kolonien nicht mehr zur Entwicklung kommen.

2. Vergleichende Gegenüberstellung der Kulturergebnisse

a) Das Wachstum überhaupt

Bei den untersuchten 30 Fällen sind je Nährbodenart jeweils 3 Röhrchen angesetzt worden.

Es zeigte sich, daß

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz in 28 Versuchen = 93,3%

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz in 27 Versuchen = 90 %

TB-Wachstum auftrat.

Bei dem Vergleich der Röhrchen verschiebt sich mehr das Bild und zeigt, daß

auf modif. P.-W. mit Ester in 78 Röhrchen = 86,6%

auf modif. P.-W. mit Ester und Phosphatzusatz in 73 Röhrchen = 81,1%

TB-Wachstum erschien.

Der phosphathaltige Ester-P.-W. zeigt weniger bewachsene Röhrchen als der nur esterhaltige.

b) Wachstumsbeginn

zeigte sich auf modif. P.-W. mit Ester und auf modif. P.-W. mit Ester und Phosphatzusatz gleichsinnig zwischen dem 4. und 35. Tag. Einzelheiten können aus nachstehenden 2 Übersichten entnommen werden.

Tabelle 3a

Vergleichende Gegenüberstellung des ersten Wachstums bei den Fällen der Versuchsreihe II

Erstes Wachstum			Petragnani-Witte + Ester 10:0,5	Petragnani-Witte + Ester 10:0,5 + K_2HPO_4
nach 4	Tagen		3	4
nach 5	Tagen		5	4
nach 6	Tagen		5	3
nach 7	Tagen		—	4
nach 8	Tagen		4	3
nach 9	Tagen		—	—
nach 10	Tagen		—	—
nach 11—15	Tagen		5	4
nach 16—20	Tagen		2	2
nach 21—25	Tagen		—	—
nach 26—30	Tagen		1	—
nach 31—35	Tagen		3	3
Insgesamt sind angegangen			28	27
Kein Wachstum			1	2
Durch Verunreinigung ausgefallen				
Pilzbefall:			—	—
Bakterielle Verunreinigung:			1	1
			30	30
			Fälle	Fälle

Tabelle 3b

Vergleichende Gegenüberstellung des ersten Wachstums bei den Röhrchen der Versuchsreihe II

Erstes Wachstum			Petragnani-Witte + Ester 10:0,5	Petragnani-Witte + Ester 10:0,5 + K_2HPO_4
nach 4	Tagen		4	4
nach 5	Tagen		14	17
nach 6	Tagen		12	6
nach 7	Tagen		2	8
nach 8	Tagen		10	10
nach 9	Tagen		1	—

Fortsetzung von Tabelle 3b

nach 10 Tagen	—	—
nach 11—15 Tagen	16	13
nach 16—20 Tagen	6	5
nach 21—25 Tagen	—	2
nach 26—30 Tagen	1	—
nach 31—35 Tagen	12	8
Insgesamt sind angegangen	78	73
Kein Wachstum	7	14
Durch Verunreinigung ausgefallen:		
Pilzbefall:	1	—
Bakterielle Verunreinigung	4	3
	90	90
	Röhrchen	Röhrchen

Auf phosphathaltigem Ester-P.-W. ist das Durchschnittswachstum um 1,2 Tage kürzer als auf esterhaltigem.

Es beträgt bei je 90 Röhrchen

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz 12,7 Tage

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz 11,5 Tage

Nur bei dieser Versuchsreihe konnte schon am 4. Tage in Form weißer Pünktchen bei verschiedenen Versuchen Wachstum gesehen werden.

Das Ursprungsmaterial stammte einmal von milchinfizierten Meerschweinchen, in zwei Versuchen von Rindern, einmal vom Schwein, einmal war es Kuhmilch. Bei der mikroskopischen Untersuchung dieser am 4. Tag gewachsenen Kolonien wurden in 2 Fällen auf beiden Nährbodenarten zur Hälfte nicht säurefeste Stäbchen gefunden. Diese am 4. Tag angegangenen Kolonien wurden in 3 Fällen an Meerschweinchen verimpft und erwiesen sich als voll virulente Tuberkelbakterienkolonien (Tv. Nr. 20, 23, 24).

Kein Wachstum bei der Untersuchung von 30 Fällen ist zu verzeichnen

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz in 1 Versuch = 3,3%

auf modif. P.-W. mit Ester- u. Phosphatzusatz in 2 Versuchen = 6,6%

Kein Wachstum bei 90 Röhrchen je Nährbodenart konnte

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz in 7 Röhrchen = 7,7%

auf modif. P.-W. mit Ester- u. Phosphatzusatz in 13 Röhrchen = 14,4%

beobachtet werden.

Die geringere Zahl der nicht angegangenen Versuche und der unbewachsenen Röhrchen zeigt der phosphatfreie Nährboden.

c) Verunreinigungen

Bei den 30 Fällen fielen bei Vorbehandlung mit 1,5 vol%iger Salzsäure, die auf 50° C erwärmt worden war

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz 1 Versuch = 3,3%

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz 1 Versuch = 3,3%

durch bakterielle Verunreinigung aus.

Verunreinigungen bei je 90 Röhrchen sind

auf modif. P.-W. mit Esterzusatz in 5 Röhrchen = 5,5%

(bakterielle Verunreinigung 4 Röhrchen)

(Schimmelpilzbefall 1 Röhrchen)

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz in 3 Röhrchen = 3,3%

bakterielle Verunreinigungen aufgetreten.

Der ester- und phosphathaltige P.-W. ist weniger anfällig für Verunreinigungen, er zeigt 2,2% weniger Nährbodenausfälle als der phosphatfreie.

d) Wachstumsstärke

Eine Übersicht über die Anzahl der gewachsenen Kolonien gibt die Tabelle 3, sowie die nachstehende Aufstellung über die Wachstumsstärke in der Versuchsreihe II.

Tabelle 3c

Wachstumsstärke	Petragnani-Witte + Ester 10:0,5	Petragnani-Witte + Ester 10:0,5 + K ₂ HPO ₄
(+) 1—10 Einzelkolonien	17 mal	14 mal
+ 11—30 Einzelkolonien	12 mal	10 mal
++ 31—100 Einzelkolonien	18 mal	19 mal
+++ üb. 100 jedoch noch Einzelkolonien	7 mal	8 mal
R Rasenwachstum allein	16 mal	18 mal
Rasen und Einzelkolonien	8 mal	4 mal
Bewachsene Röhrchen insgesamt	78	73

Durch den Phosphatzusatz ist kein augenfälliger Unterschied in Zahl, Größe und Pigmentierung der Kolonien sowie in ihren Wuchsformen aufgetreten. Die Kolonien sind gleichmäßig üppig auf beiden Nährböden. Im Vergleich zu Kolonien auf gewöhnlichen P.-W.-Nährböden fällt im allgemeinen eine kräftigere Kolonieentwicklung mit intensiverer Pigmentierung der bröckligen Sandhaufen und Blumenkohlformen auf.

Rasenbildung trat in dieser Versuchsreihe allein und mit Einzelkolonien vergesellschaftet auf. Der Phosphatzusatz scheint für die Rasenbildung weniger zuträglich zu sein. In 2 Versuchen trat auf phosphatfreiem Nährboden die Rasenbildung schon 3, bzw. 6 Tage früher auf. (Vers. Nr. 54, 65). Auch ist die Uppigkeit des Rasens auf diesen Nährböden augenfälliger. Der Rasen erschien frühestens am 11. Tag, sonst am 12., 14., 16., 20., 22. und 25. Tag. Das Ursprungsmaterial der Versuche mit Rasenbildung stammte in 5 Fällen von milchinfiiziertem Meerschweinchen, 1 mal vom Rind, 2 mal aus Kuhmilch, 1 mal vom Schwein.

Der Vergleich des phosphathaltigen zum phosphatfreien Ester-Petragnani-Witte-Nährboden ist in dieser Versuchsreihe dargetan worden. Wegen der Verkürzung des Durchschnittswachstums um 1,2 Tage durch den Phosphatzusatz wurde in der nächsten Reihe diese Modifikation beibehalten und zu gewöhnlichem Petragani-Witte-Nährboden verglichen.

Versuchsreihe III

(siehe Tabelle 4, zwischen S. 32 und 33)

Ziel dieser Versuchsreihe ist, festzustellen, ob bei Verwendung des in der II. Versuchsreihe erprobten phosphathaltigen Ester-Petragnani-Witte-Nährbodens ein wesentlicher Unterschied bezüglich Wachstumsbeginns der TB-Kolonien gegenüber gewöhnlichem P.-W. auftritt.

Material: 10 Fälle tuberkulöses Organmaterial von Rindern, Schweinen, Meerschweinchen, tuberkelbakterienhaltige Kuh- und Ziegenmilch.

Vorbehandlung: 1,5 vol%ige Salzsäure auf 50° C erwärmt bei 20-minütiger Einwirkung.

Nährboden:

1. Petragani-Witte
mit Glycerin-Schwefelsäure-Ester 10:0,5
(0,5 ccm Ester auf 100 ccm Nährbodenmasse) und Dikaliumphosphat,
0,07 g K_2HPO_4 auf 100 ccm Nährbodenmasse.
2. Petragani-Witte
mit Glycerin
3. Petragani-Witte
ohne Glycerin

Zusammenfassung der Versuchsreihe III

1. Vergleich der Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung und der Kulturversuche

Bei Ausführung beider Färbemethoden wurde das verwendete Ausgangsmaterial für die Kulturversuche

8 mal mikroskopisch positiv = 80%

2 mal mikroskopisch negativ = 20% befunden,

wohingegen die Kulturen in allen 10 Versuchen = 100% Wachstum von TB-Kolonien zeigten.

2. Vergleichende Gegenüberstellung der Kultur- ergebnisse

a) Das Wachstum überhaupt

Von den 10 Versuchen sind je Nährbodenart jeweils 3 Röhrchen beimpft worden. Dabei trat auf dem modif. P.-W. mit Ester und

Phosphatzusatz in 9 Versuchen = 90%

auf P.-W. mit Glyzerin in 9 Versuchen = 90%

auf P.-W. ohne Glyzerin in 10 Versuchen = 100%

Wachstum von TB-Kolonien auf.

Bei je 30 verglichenen Röhrchen verschiebt sich das Bild und zeigt, daß

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz

in 26 Röhrchen = 87 %

auf P.-W. mit Glyzerin in 25 Röhrchen = 83,3%

auf P.-W. ohne Glyzerin in 30 Röhrchen = 100 %

Wachstum von TB-Kolonien festzustellen war.

Der phosphathaltige Ester-P.-W. steht somit an zweiter Stelle mit 3,7% mehr bewachsenen Röhrchen als auf glyzerinhaltigem P.-W. und mit 13% weniger bewachsenen Röhrchen als auf glyzerinfreiem P.-W.

Aus der mikroskopisch positiv befundenen Ziegenmilch (Vers. Nr. 82) ist TB-Wachstum nur auf glyzerinfreiem P.-W. aufgetreten und zwar gleichmäßig am 28. Tag auf allen 3 Röhrchen, während die glyzerinhaltigen wie die ester- und phosphathaltigen unbewachsen blieben.

Aus der gleichfalls mikroskopisch positiven Kuhmilch ist Wachstum wohl auf allen 3 Nährbodenarten aufgetreten, aber zu verschiedenen Zeiten: Auf glyzerinfreiem P.-W. wuchsen Kolonien am 19. Tag auf allen 3 Röhrchen, auf ester- und phosphathaltigem P.-W. am 23. Tag auf allen 3 Röhrchen und auf glyzerinhaltigem am 50. Tag auf nur einem Röhrchen.

b) Wachstumsbeginn

zeigte sich auf modif. P.-W. mit Ester und

Zusammenfassung der Versuchsreihe III

auch 3 Röhren, auf ester- und phosphatartigem i. v. am 25. Tag
auf allen 3 Röhren und auf glyzerinhaltigem am 50. Tag auf nur
einem Röhren.

b) Wachstumsbeginn

zeigte sich auf modif. P.-W. mit Ester und

Phosphatzusatz	zwischen dem 6. und 23. Tag
auf P.-W. ohne Glycerin	zwischen dem 7. und 28. Tag.
auf P.-W. mit Glycerin	zwischen dem 6. und 50. Tag

Einzelheiten sind aus nachstehenden 2 Übersichten ersichtlich.

Tabelle 4a

Vergleichende Gegenüberstellung des ersten Wachstums bei den Fällen der Versuchsreihe III

Erstes Wachstum	Petragnani-Witte + Ester 10:0,5 + K_2HPO_4	Petragnani-Witte mit Glycerin	Petragnani-Witte ohne Glycerin
nach 4 Tagen	—	—	—
nach 5 Tagen	—	—	—
nach 6 Tagen	5	4	—
nach 7 Tagen	—	1	3
nach 8 Tagen	—	—	1
nach 9 Tagen	—	—	1
nach 10 Tagen	2	2	3
nach 11—15 Tagen	1	1	1
nach 16—20 Tagen	—	—	—
nach 21—25 Tagen	1	—	1
nach 26—30 Tagen	—	—	—
nach 50 Tagen	—	1	—
Insgesamt sind			
angegangen:	9	9	10
Kein Wachstum:	1	1	—
Durch Verunreinigung ausgefallen:			
Pilzbefall:	—	—	—
Bakterielle Verunreinigung:	—	—	—
	10 Fälle	10 Fälle	10 Fälle

Tabelle 4b

Vergleichende Gegenüberstellung des ersten Wachstums bei den
Röhrchen der Versuchsreihe III

Erstes Wachstum	Petragnani-Witte + Ester 10:0,5 + K ₂ HPO ₄	Petragnani-Witte mit Glyzerin	Petragnani-Witte ohne Glyzerin
nach 4 Tagen	—	—	—
nach 5 Tagen	—	—	—
nach 6 Tagen	8	11	—
nach 7 Tagen	5	2	6
nach 8 Tagen	1	—	1
nach 9 Tagen	—	1	2
nach 10 Tagen	4	6	3
nach 11—15 Tagen	5	4	11
nach 16—20 Tagen	—	—	4
nach 21—25 Tagen	3	—	—
nach 26—30 Tagen	—	—	3
nach 50 Tagen	—	1	—
Insgesamt sind angegangen:	26	25	30
Kein Wachstum:	3	5	—
Durch Verunreinigung ausgefallen:			
Pilzbefall:	1	—	—
Bakterielle Verunreinigung:	—	—	—
	30	30	30
	Röhrchen	Röhrchen	Röhrchen

Das Durchschnittswachstum auf phosphathaltigem Ester-P.-W. braucht 0,2 Tage länger als auf glyzerinhaltigem und 3 Tage weniger als auf glyzerinfreiem P.-W.

Es beträgt bei je 30 Röhrchen

auf modif. P.-W. mit Ester- u. Phosphatzusatz 9,9 Tage

auf P.-W. mit Glyzerin 9,7 Tage

auf P.-W. ohne Glyzerin 12,7 Tage

Kein Wachstum auf allen drei Nährböden zugleich ist in keinem Versuch festgestellt worden.

Kein Wachstum bei 10 Versuchen ist festzustellen

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz in 1 Versuch = 10%

auf P.-W. mit Glyzerin in 1 Versuch = 10%

auf P.-W. ohne Glyzerin in 0 Versuchen = 0%

Kein Wachstum bei 30 Röhrchen je Nährbodenart konnte auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz in 3 Röhrchen = 10 % auf P.-W. mit Glycerin in 5 Röhrchen = 16,6% auf P.-W. ohne Glycerin in 0 Röhrchen = 0 % beobachtet werden.

Die geringste Zahl unbewachsener Röhrchen zeigt in dieser Reihe der glyzerinfreie P.-W.

c) Verunreinigungen

Von den 10 untersuchten Fällen fiel bei Vorbehandlung mit 1,5 vol%iger Salzsäure, die auf 50  C erwärmt worden war, auf allen 3 Nährbodenarten kein Fall durch bakterielle Verunreinigung oder Schimmelpilzbefall aus.

Verunreinigungen bei je 30 Röhrchen durch Schimmelpilzbefall sind aufgetreten:

auf modif. P.-W. mit Ester- und Phosphatzusatz in 1 Röhrchen = 3,3%
auf P.-W. mit Glycerin in 0 Röhrchen = 0 %
auf P.-W. ohne Glycerin in 0 Röhrchen = 0 %

Der modifizierte Ester-Phosphat-P.-W. scheint nach vorstehendem Vergleich anfälliger für Schimmelpilzbefall zu sein als die gewöhnlichen P.-W.-Nährböden, eine Beobachtung die auch den Erfahrungen der vorausgegangenen Versuchsreihen entspricht.

d) Wachstumsstärke

Eine Übersicht über die gewachsenen Kolonien gibt die Tabelle 4, sowie die nachstehende Aufstellung über die Wachstumsstärke in der Versuchsreihe III.

Tabelle 4c

Wachstumsstärke			Petr.-Witte + Ester + K_2HPO_4	Petr.-Witte mit Glycerin	Petr.-Witte ohne Glycerin
(+)	1—10	Einzelkolonien	5 mal	8 mal	11 mal
+	11—30	Einzelkolonien	9 mal	7 mal	3 mal
++	31—100	Einzelkolonien	6 mal	4 mal	6 mal
+++	�b. 100, jedoch noch Einzelkolonien		— mal	— mal	— mal
R	Rasenwachstum allein		— mal	— mal	1 mal
	Rasen und Einzelkolonien		6 mal	6 mal	9 mal
Bewachsene Röhrchen insgesamt			26	25	30

Bei Vergleich der Koloniegröße ließ sich in dieser Versuchsreihe ebenfalls feststellen, daß auf dem ester- und phosphathaltigen Petrag-nani-Witte-Nährboden die Einzelkolonien üppiger und umfangreicher auftraten und rascher wuchsen als auf den beiden gewöhnlichen Vergleichs-P.-W.-Nährböden. Die Pigmentierung der Blumenkohl- und Warzenform ist intensiver auf den modifizierten Nährböden. In einigen Röhrchen zeigten die üppigsten Blumenkohlformen schmutziggelbe Färbung und einen Besatz mit weißen Stippchen. Rasenbildung wurde in dieser Versuchsreihe nur in Verbindung mit Einzelkolonien beobachtet. Sie trat bevorzugt auf glyzerinfreiem P.-W. auf und wurde hier in 4 Versuchen beobachtet, doch in zwei Versuchen zeigte sich auch auf ester- und phosphathaltigem bzw. auf glyzerinhaltigem P.-W.-Rasen. Er erschien am 15., 16. und 18. Tage, nachdem vorher schon Einzelkolonien angegangen waren. Die vor der Rasenbildung angegangenen Einzelkolonien zeigten zweimal die Form weißlicher oder bräunlicher Stippchen, einmal Brustwarzenform und einmal bräunliche Blumenkohlformen. Das Ursprungsmaterial, das zur Rasenbildung führte, stammte zweimal von Meerschweinchen und zweimal von Rindern.

In der III. Versuchsreihe wurde wie in der I. der Vergleich von modifiziertem P.-W. zu gewöhnlichen P.-W.-Nährböden mit und ohne Glycerinzusatz angestellt.

Durch Herabsetzung der Schwefelsäuremenge im Ester auf die Hälfte und der dem Nährboden zugesetzten Estermenge gleichfalls um die Hälfte, sowie durch Phosphatzusatz lassen sich folgende Unterschiede gegenüber dem in Versuchsreihe I erprobten esterhaltigen P.-W. feststellen:

Auftreten des Wachstums: auf dem esterphosphathaltigen P.-W. sind 9,5% mehr Röhrchen angegangen als auf dem esterhaltigen P.-W.

Im Durchschnittswachstum ist eine Verbesserung auf ester- und phosphathaltigem P.-W. gegenüber dem esterhaltigen dadurch erreicht, daß es dem Durchschnittswachstum des glyzerinhaltigen P.-W. bis auf 0,2 Tage angeglichen wurde; während auf esterhaltigem P.-W. noch 0,7 Tage Unterschied zu dem glyzerinhaltigen P.-W. bestehen, ist dies auf ester- und phosphathaltigem P.-W. nur noch 0,2 Tage. Die Verbesserung der Durchschnittswachstumsdifferenz beträgt somit 0,5 Tage.

Schimmelpilzbefall ist auf ester- und phosphathaltigem P.-W. um 0,8% mehr als auf esterhaltigem aufgetreten.

Die durchschnittliche Wachstumsstärke zeigt auf ester-phosphathaltigem P.-W. etwa 20% Kolonien pro Röhrchen mehr als auf glyzerinhaltigem und etwa 15% mehr als auf glyzerinfreiem P.-W. Auf dem esterhaltigen P.-W. wuchsen ca. 10% Kolonien mehr als auf glyzerinhaltigem und ca. 25% mehr als auf glyzerinfreiem P.-W.

B) Die weitere Untersuchung des in den 3 Versuchsreihen erzielten Wachstums

Um den Nachweis zu führen, daß die gezüchteten Kolonien TB-Kolonien sind, wurde

- a) die mikroskopische Untersuchung,
- b) die kulturelle Überprüfung auf Schrägagar und
- c) die Pathogenitätsprüfung im Tierversuch

durchgeführt.

a) Die mikroskopische Untersuchung

Sie wurde durch Feststellung der morphologischen und tinktoriellen Eigenschaften des erzielten Wachstums vorgenommen. Es wurden alle 87 positiven Kulturversuche mikroskopisch untersucht. Die Untersuchung wurde frühestens 14 Tage nach Wachstumsbeginn vorgenommen. Der Ausstrich wurde nach Ziehl-Neelsen gefärbt.

Der Form nach ließen sich Unterschiede bei den einzelnen Fällen feststellen: Im mikroskopischen Bilde zeigten sich schlanke, lange Stäbchen und kürzere, plumpere ovoide Formen. Die Nährbodenart hatte keinen Einfluß.

Hinsichtlich der Alkohol- und Säurefestigkeit zeigte sich, daß in 50% der gewachsenen Einzelkolonien in geringerer Zahl (10—20%) blaufarbte Stäbchen vorkamen. Besonders schnell gewachsene, üppige Kolonien wiesen einen größeren Prozentsatz Nichtsäurefester auf. Neben der Wachstumszeit spielt auch der Nährboden eine Rolle. Auf dem esterhaltigen und glyzerinhaltigen Nährboden waren in 55% der 87 Versuche neben Säurefesten auch Nichtsäurefeste feststellbar, während glyzerinfreie Nährböden nur in 43% der Versuche Mischformen aufwiesen.

In 8 Versuchen (= 9,4%) waren auf ersterhaltigem Petagnani zu 50% nichtsäurefeste blaufarbte Stäbchen neben Säurefesten vorhanden. Diese Beobachtung wurde 12—14 Tage nach Ansetzen der Kultur und nur in Einzelkolonien (Vers. Nr. 10, 13, 17, 68, 80, 89, 90) gemacht. In 3 von diesen Versuchen (Vers. Nr. 68, 80, 81) waren bei wiederholter Untersuchung nach 40, 45 bzw. 54 Tagen zu 80% rote, säurefeste Formen nachzuweisen. In den anderen 5 Versuchen (Vers. Nr. 10, 13, 17, 89, 90) wurden bis 64 Tage nach Wachstumsbeginn in denselben Kolonien zur Hälfte nichtsäurefeste Stäbchen gefunden.

In zwei Tierversuchen erwiesen sich die zur Hälfte aus Nichtsäurefesten bestehenden Kolonien als pathogen (Tv. Nr. 31, 20). In den 21 Versuchen, in denen Rasenbildung auftrat, wurden ausschließlich alkohol- und säurefeste Stäbchen beobachtet.

b) Die kulturelle Überprüfung

der gewachsenen Kulturen wurde nach Überimpfung auf Schrägagar vorgenommen. Es wurden nur die auf den Versuchsnährböden gewach-

senen Kolonien der Hauptversuche übertragen. Die 28 für den Tierversuch ausgewählten Kulturen wurden auf je 2, die übrigen auf je 1 Agarröhrchen überimpft. Zur Verimpfung kamen Einzelkolonien oder Teile des Rasens. Die Röhrchen wurden mit abgeflamten Zellstoffpfropfen verschlossen und eine Woche im Brutschrank gehalten. Wachstum wurde nicht beobachtet, so daß auf Grund der kulturellen Überprüfung die gewachsenen Kolonien mit großer Wahrscheinlichkeit als TB-Kolonien angesprochen werden können.

c) Tierversuch

(siehe Tabelle 5, zwischen S. 40 und 41)

Dieser wurde zur Prüfung der Pathogenität des erzielten Wachstums vorgenommen, um auf Agar eventuell nicht angegangene apathogene Mykobakterien auf diesem Wege mit Sicherheit auszuschließen. Aus den Hauptversuchen der Versuchsreihen I, II, III wurden 28 Fälle zur Pathogenitätsprüfung ausgewählt. In 3 Versuchen wurden je zwei, in 25 Versuchen je ein Meerschweinchen geimpft. Insgesamt wurden 31 Tiere für die Untersuchung herangezogen. Zur Verimpfung kamen nur Kolonien, die auf den modifizierten Versuchsnährböden gewachsen waren. Die Auswahl der Kolonien erfolgte nach Wuchsform, Nichtsäurefestigkeit und besonders frühem Wachstum. 5 mal wurden Rasen verimpft, 26 mal Einzelkolonien. Nichtsäurefeste Kolonien kamen zweimal zur Verimpfung. Die ausgewählten Kulturen wurden unter sterilen Kautelen abgenommen und in 3 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung gut verteilt. Von dieser Suspension wurde je 1 ccm in die rechte Kniefalte eines Meerschweinchens injiziert. Die Tiere wurden, falls nicht inzwischen gestorben, nach 6 Wochen getötet. Zur Sicherung der Diagnose wurden jeweils aus dem regionären Lymphknoten und den Organen Objektträgerausstriche gemacht, nach Ziehl-Neelsen und nach Buss gefärbt und mikroskopisch auf Tuberkelbakterien untersucht.

Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Tierversuche.

Bei dem Material aus 28 verimpften Fällen wurde 20 mal durch den positiven Ausgang des Tierversuches Tuberkulose festgestellt. Von den 31 geimpften Meerschweinchen konnte bei 22 eine tuberkulöse Erkrankung nachgewiesen werden, bei 9 ergab die Sektion einen negativen Befund.

Von den 22 Tbc-positiven Meerschweinchen zeigten

19 eine generalisierte Tuberkulose,

2 eine Schwellung oder Abszedierung des reg. Lymphknotens,

1 eine latente Infektion.

Die 5 mit Rasenaufschwemmung geimpften Meerschweinchen zeigten

alle eine stark generalisierte Tbc., 3 davon starben vor Ablauf der Wartezeit.

Von den 26 mit Einzelkolonienaufschwemmung geimpften Meerschweinchen erkrankten 17 Tiere, und zwar 12 an generalisierter Tbc., 2 zeigten nur Abszedierung oder Schwellung des regionären Lymphknotens, 1 wies eine latente Infektion auf; dabei erschien der regionäre Lymphknoten unwesentlich vergrößert. Im nach Ziehl-Neelsen gefärbten Milzabstrich wurden einzelne alkohol- und säurefeste Stäbchen gefunden. Bei zwei Meerschweinchen (Nr. 24, 28), deren regionäre Lymphknoten Schwellung bzw. Abszedierung zeigten, konnten ebenfalls in der unveränderten Milz alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden. 8 von den Meerschweinchen starben vor Ablauf der Wartezeit.

Von den 9 negativen Tierversuchen starben 2 Meerschweinchen (Nr. 1, 5) vorzeitig. 6 davon waren mit 90, bzw. über 90 Tage alten Kulturen geimpft (Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10). Beim 9. ohne pathologischen Befund getöteten Meerschweinchen (Nr. 21) war eine Infektion nicht nachweisbar, obwohl die Kultur aus veränderten Meerschweinchenorganen gezüchtet und bei der Verimpfung erst 38 Tage alt war.

Die mit nichtsäurefesten Kulturen geimpften Meerschweinchen (Nr. 31, 20) starben beide vor Ablauf der Wartezeit. Nr. 31 wies bei der Sektion eine generalisierte Miliartuberkulose, Nr. 20 einen Lymphknotenabszeß und eine latente Infektion der Milz auf. Die am 4. Tage angegangenen Kulturen, verimpft auf die Meerschweinchen Nr. 20, 23 und 24, riefen bei 2 Meerschweinchen eine Abszedierung bzw. Schwellung des reg. Lymphknotens und latente Infektion der Milz hervor, beim dritten eine generalisierte Tbc. Drei bereits nach 5 Tagen gewachsene Kulturen — (s. die Meerschweinchen Nr. 7, 9 und 21) — erzeugten bei 2 Tieren eine generalisierte Tbc, beim dritten war der Sektionsbefund negativ.

Das Alter der Kulturen ist von Einfluß auf die Pathogenität. Von den verimpften Kulturen waren zehn 90 und mehr Tage alt, die übrigen waren 80 Tage alt und jünger. Von den ersteren Kulturen erzeugten nur 2 eine tuberkulöse Erkrankung der Meerschweinchen. Diese beiden Kulturen waren 90 und 112 Tage alt. Die restlichen 8 der mit alten Kulturen geimpften Meerschweinchen waren bei der Sektion ohne pathologischen Befund. Kulturen, die 80 Tage alt und jünger waren, zeigten sich voll virulent und erzeugten bei 20 von 21 geimpften Meerschweinchen eine tuberkulöse Erkrankung.

Durch den positiven Ausgang des Tierversuches ist in 20 von 28 Versuchen der sichere Beweis erbracht, daß es sich um TB-Kulturen gehandelt hat. In 7 Versuchen dürfte für den negativen Ausgang des Tierversuches eine Erklärung im zu hohen Alter der verimpften Kulturen sowie in interkurrenten Todesfällen der beimpften Meerschweinchen gegeben sein.

IV. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Aufgabe dieser Arbeit war, zu untersuchen, inwiefern ein Zusatz von Glycerin-Schwefelsäure-Ester zum Petragani-Witte-Nährboden das Wachstum von TB beeinflusst. In Erfüllung des erhaltenen Auftrages wurden nach einleitenden Vorversuchen zur Ermittlung des bei dem Versuchsnährboden optimal wirksamen Vorbehandlungsverfahrens folgende Untersuchungen durchgeführt.

In Versuchsreihe I wurde durch Esterzusatz modifizierter Petragani-Witte-Nährboden mit gewöhnlichem Petragani-Witte-Nährboden mit und ohne Glycerin verglichen.

In Versuchsreihe II wurde esterhaltiger dem ester- und phosphathaltigen Petragani-Witte-Nährboden gegenübergestellt. In Reihe III kam schließlich der ester-phosphathaltige Petragani-Witte-Nährboden wieder mit dem Originalnährboden mit und ohne Glycerinzusatz zum Vergleich.

Die Untersuchungen erbrachten nachstehende Ergebnisse:

- a) Die Wachstumsstärke wurde durch Esterzusatz günstig beeinflusst. Auf dem 10/1 esterhaltigen P.-W. der Reihe I konnten durchschnittlich etwa 10% mehr Kolonien pro Röhrchen als auf glyzerinhaltigem und etwa 25% mehr als auf glyzerinfreiem Vergleichs-P.-W. erzielt werden. Auf dem ester- und phosphathaltigen P.-W. der Reihe III konnten ca. 20% mehr Kolonien als auf glyzerinhaltigem und ca. 15% mehr als auf glyzerinfreiem P.-W. erzielt werden.
- b) Auf den esterhaltigen Modifikationen zeigten die Einzelkolonien eine beträchtliche Größe und üppigere Entwicklung als auf den gewöhnlichen Vergleichs-Petragani-Nährböden; die sandhaufenförmigen und blumenkohlähnlichen Kolonien ließen eine stärkere Pigmentierung erkennen.
- c) Durch den Esterzusatz konnte eine Verkürzung der Wachstumszeit nicht erreicht werden. Auf dem esterhaltigen Versuchs-P.-W. der I. Reihe betrug das Durchschnittswachstum um 0,7 Tage mehr als auf glyzerinhaltigem P.-W. und 1,6 Tage weniger als auf glyzerinfreiem P.-W. In der Reihe III konnte durch Verminderung der Schwefelsäuremenge im Ester sowie des Esterzusatzes und durch die Zugabe von Dikaliumphosphat eine weitgehende Angleichung der Durchschnittswachstumszeit für den Versuchs-Nährboden an das des glyzerinhaltigen Originalnährbodens erreicht werden. Sie ist hier im Durchschnitt nur noch um 0,2 Tage länger als die des glyzerinhaltigen, aber um 3 Tage kürzer als die des glyzerinfreien P.-W.-Nährbodens.

- d) Durch den Esterzusatz ist die Anfälligkeit der Versuchsnährböden für den Schimmelpilzbefall größer geworden.
- e) Auf den Versuchsnährböden konnten einschließlich der Vorversuche von 90 Materialproben in 87 Versuchen (= 96,6%) TB nachgewiesen werden. Die mikroskopische Untersuchung des erzielten Wachstums ergab in allen Versuchen alkohol- und säurefeste Stäbchen. Im Rasen wurden ausschließlich säurefeste Stäbchen gefunden. In den Einzelkolonien waren in der Hälfte der Versuche bis zu $\frac{1}{5}$ Nichtsäurefeste beigemischt. Nichtsäurefeste zur Hälfte neben Säurefesten wurden 8 mal in kurzfristig angegangenen Kolonien nach 14 Tagen beobachtet; zum Teil bildete sich die Säurefestigkeit nachträglich noch aus, zum Teil nicht. Wahrscheinlich handelte es sich um eine Verunreinigung mit apathogenen Mykobakterien.
- f) Im Tierversuch zeigten die verimpften Kulturen verschiedene Virulenz und Lebensfähigkeit. Besonders ausgeprägte Generalisation zeigten 4 mit Rasensuspension geimpfte Meerschweinchen, von denen 3 vor Ablauf der Wartezeit starben. Nichtsäurefeste Kolonien erzeugten ebenfalls eine tuberkulöse Erkrankung der Meerschweinchen. Auch nach 4 und 5 Tagen gewachsene TB-Kolonien erwiesen sich als voll virulent. Über 90 Tage alte Kulturen waren nur in Ausnahmefällen noch pathogen, hingegen erzeugten Kulturen, die jünger als 80 Tage waren, in 20 von 21 Versuchen eine tuberkulöse Erkrankung der Meerschweinchen.

Schlußsätze

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, daß der Schwefelsäure-Glyzerinester als Zusatz zum Petagnani-Witte-Nährboden insofern wachstumsfördernd auf die Tuberkelbakterien wirkt, als ihre Kolonien vermehrt, größer, üppiger und stärker pigmentiert sind. Die allgemeine Durchschnittswachstumszeit der TB bleibt jedoch unberührt. Dabei erwies sich eine Modifikation des Petagnani-Witte-Nährbodens mit Zusatz von 0,5 ccm Ester, bereitet aus 10 ccm Glyzerin und 0,5 ccm Schwefelsäure und von 0,07 g Dikaliumphosphat zu 100 ccm Nährbodenmasse am günstigsten für die Tuberkelbakterien. Leider scheint dieser Nährboden aber für Schimmelpilzbefall erhöht anfällig zu sein.

Am Schlusse meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. H. Keller für den mir erteilten Untersuchungsauftrag, sowie für das ständige, meinen Arbeiten entgegengebrachte Interesse. Herrn Dr. W. Buss und Herrn Dr. K. Lang danke ich für die Unterstützung bei meinen Arbeiten.

V. Literaturverzeichnis

1. Beller: Leistungsfähigkeit und Bedeutung von Kultur- und Tierversuch für die Typenbestimmung bei Tuberkulose. Zbl. Bakter. Orig. 154, 21 (1949).
2. Breul: Beitrag zur Züchtungsmethodik der Tuberkelbakterien aus Milch unter Verwendung von Salzsäure und Wärme. Inaug. Diss. Gießen 1951.
3. Brodhage: Erstisolierung von Tuberkelbazillen aus pathologischem Material auf festen Dubos-Nährböden. Z. f. Hyg. 132, 105 (1951).
4. Buss: Der mikroskopische Nachweis der Tuberkelbakterien. Der Lebensmitteltierarzt 2, 151 (1951).
5. Buss: Tuberkelbakterien in pasteurisierter Vollmilch. Der Lebensmitteltierarzt 3, 7 (1952).
6. Buss und Lang: Rindertuberkulose und Milchhygiene. Der Lebensmitteltierarzt 1, 52 (1950).
7. Dißmann: Erfahrungen mit der Karbolnachtsblaufärbung der Tuberkelbazillen nach Hallberg. Zbl. Bakter. I Orig. 150 268 (1943).
8. Ehrlich: zit. nach Steigner (49).
9. Ficus: Vergleichende Untersuchungen von Salzsäure, Schwefelsäure und Sputosol als Vorbehandlungsmittel bei tuberkulösem Sputummaterial zur Erzielung von TB Reinkulturen. Inaug. Diss. Hannover 1951.
10. Gottsacker: „Die Kultur des Erregers der Tuberkulose“. Substrat 4-Sauton auf Sauton-Agar. Zbl. Bakter. Orig. 154, 293 (1949). Die Bedeutung der Feuchtigkeit und ihre Erhaltung. Zbl. Bakter. Orig. 154, 347 (1949). Sauton-Substrat mit Zusätzen von Gesamtei u. Eigelb. Zbl. Bakter. Orig. 156, 204 (1950/51). Die Differenzierung der Typen auf Eigelbnährböden. Zbl. Bakter. Orig. 156, 351 (1950/51).
11. Hedderich: Züchtung von Tuberkelbakterien aus Milch mit Hilfe des Schwefelsäurebehandlungsverfahrens nach Erhitzung der Milch auf 55° C. Inaug. Diss. Gießen 1953.
12. Herrmann, E.: Zur Frage der Kultur des Tuberkelbazillus und ihre Verwendung zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. Bakter. Orig. 102, 169 (1927).

13. Herrmann, W., Beiträge zur Tuberkelbakterienkultur II. Mitteilung. Z. f. Hyg. 129, 147 (1949).
14. Hohn: Die Kultur des Tuberkelbazillus zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. Bakter. Orig. 98, 460 (1926).
15. Hohn: Vier Jahre Kultur des Tuberkelbazillus zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. Bakter. Orig. 113, 366 (1929).
16. Hohn: Der Z-Ei-Nährboden zur Kultur des Tuberkelbazillus. Zbl. Bakter. Orig. 121, 488 (1931).
17. Hohn: Zur Frage des Verschlusses der Nährböden bei der Tuberkelbazillenkultur. Zbl. Bakter. Orig. 130, 457 (1933/34).
18. Hohn: Ein neuer Nährboden zur Tuberkelbazillenkultur (Substrat 4) und ein einfacher Verschluß für die Eiröhrchen (Kapsenbergkappe). Zbl. Bakter. Orig. 145, 145 (1940).
19. Hohn: Die Kultur des Tuberkelbazillus zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. Bakter. Orig. 98, 460 (1950).
20. Hussel: Über die Eignung des Goldhamsters als Versuchstier bei der Tuberkulosedagnostik. Zbl. Bakter. Orig. 156, 445 (1950/51).
21. Hutyra-Marek-Manninger: Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere I. Band. 9. Auflage, Gustav Fischer, Jena 1945.
22. Kirchner: zit. nach Herrmann W. (13).
23. Klimmer-Schönberg: Milchkunde und Milchhygiene. 6. Auflage, Verlag M. u. H. Schaper, Hannover 1951.
24. Koch: zit. nach Hohn (15).
25. Kölbel: Untersuchungen am Mycobakterium tuberculosis I, Säurefestigkeit, Vermehrung und Granulation. Z. f. Hyg. 132, 325 (1951).
26. Kröger und Trettin: Vorkommen von Tuberkelbakterien in Abwässern und ihre seuchenhygienische Bedeutung. Zbl. Bakter. Orig. 157, 206 (1951).
27. Lämmler: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Tuberkelbakterien in der Milch und ihre Differenzierung. Diss. Gießen 1952.
28. Lichtenstein: Zur Frage der Reinzüchtung der Tuberkelbazillen. Zbl. Bakter. Orig. 108, 239 (1928).
29. Löwenstein und Sumijoshi: zit. nach Meyn (33).
30. Lubenau: zit. nach Gottesacker (10).
31. Meyn: Nachweis und Typendifferenzierung der Tuberkelbakterien. BMTW 607 (1941).
32. Meyn: Die tuberkulöse Bakteriämie des Rindes. Zbl. Bakter. Orig. 154, 15 (1949).

33. Meyn: Die Tiefenkultur des Tuberkuloseerregers und ihre diagnostische Bedeutung. *Z. f. Hyg.* **131**, 472 (1950).
34. Meyn: Über die apathogenen tuberkelbakterienähnlichen Mycobakterien und ihre Wuchsformen auf Tuberkelbakteriennährböden. *Der Lebensmitteltierarzt* **1**, 159 (1950).
35. Meyn: Die Mycobakterien der Milch. *Der Lebensmitteltierarzt* **2**, 177 (1951).
36. Mitscherlich-Reuss-Gürtürk: Der Einfluß der Vorbehandlung von tuberkulösem Material auf die Sicherheit des Nachweises von Tuberkelbakterien in Kultur und Tierversuch. *Zbl. Bakter. Orig.* **158**, 97 (1952).
37. Möllers: Die Tuberkelbazillen. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen in Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, III. Auflage Band V/2 1928, Verlag Gustav Fischer, Jena und Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien.
38. Nabholz und Beglinger F.: Erfahrungen bei der Verwendung des syrischen Goldhamsters für die Tuberkulosedagnostik. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **95**, 28 (1953).
39. Orzechowski: Vergleichende Untersuchung über die Züchtung des Tuberkelbazillus nach den Methoden Uhlenhuth und Hohn. *Zbl. Bakter. Orig.* **111**, 362 (1929).
40. Quandt: Erfahrungen mit der Karbolnachtsblaufärbung der Tuberkelbazillen in Sputum und Gewebe. *Zbl. Bakter. I. Orig.* **151**, 348 (1943).
41. Radetzky: zit. nach Gottsacker (10).
42. Reichert: Über eine zweckmäßige Nährbodenkombination zur kulturellen Diagnostik des Tuberkelbazillus. *Zbl. Bakter. Orig.* **156**, 451 (1950/51).
43. Reuss: Der syrische Goldhamster als Versuchstier bei der Tuberkulosedagnostik. *Z. f. Hyg.* **132**, 223 (1951).
44. Schmidt, B.: Die Desinfektion der Abwässer von Lungenheilstätten. *Z. f. Hyg.* **133**, 581 (1951).
45. Schrader: Die Züchtung des Tuberkelbazillus nach der Methode Hohn. *Zbl. Bakter. Orig.* **102**, 163 (1927).
46. Seelemann und Klingmüller: Die Züchtung von Tuberkelbakterien aus verschiedenen Ausgangsmaterialien mit Hilfe des sog. Säurebehandlungsverfahrens. *Zbl. Bakter. Orig.* **104**, 482 (1927).
47. Söntgen: Malachitgrün-Einährböden zum Nachweis von Tuberkelbakterien. *DTW.* **38**, 263 (1930).

48. Sonnenschein: Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrün-Einährböden. DTW. 38, 115 (1930).
49. Steigner: Die bakteriologische Diagnose der Tuberkulose. Zbl. Bakter. Orig. 153, 229 (1948/49).
50. Surányi und Putnoky: Über die Leistungsfähigkeit des direkten Züchtungsverfahrens der Tuberkelbazillen, nach Löwenstein und Sumijoshi. Zbl. Bakter. Orig. 94, 401 (1925).
51. Trautwein: Das Kulturverfahren bei Nachweis und Erforschung der Tuberkulose. DTW. 52, 680 (1936).
52. Viatschko: Die Brauchbarkeit des syrischen Goldhamsters als Versuchstier zum Tuberkulosenachweis. TU 4, 243 (1949).
53. Wagener und Mitscherlich: Fortschritte in der kulturellen Differenzierung der Tuberkelbakterien. Zbl. Bakter. Orig. 157, 87 (1950/51).
54. Wilhelm: Der Einfluß von Aceton auf die Wachstumsfähigkeit von Tuberkelbakterien. Inaug.Diss. Gießen 1950.
55. Witte: Beitrag zur Züchtung von Tuberkelbakterien unter Berücksichtigung des Typus bovinus. Z. f. Inf.Krkh. Haustiere 48, 14 (1935).
56. Wolters und Demel: Vergleichende Züchtungsversuche von bovinen Tuberkelbakterien auf Z-Einährböden nach Hohn und Malachitgrün-Einährböden nach Petragani unter Berücksichtigung der Typendifferenzierung. Zbl. Bakter. Orig. 124, 199 (1932).
58. Wurzer: Zum Nachweis der Tuberkelbakterien in Milch-, Lungen- und Gebärmuttereschleimproben. TU 6, 164 (1951).

VI. Lebenslauf

Am 25. 11. 1921 wurde ich als erster Sohn des Mittelschullehrers Rudolf Palatzky und seiner Ehefrau Maria, geborene Friedrich in Zauchtel/Nordmähren geboren. Nach Besuch der Volksschule meines Heimatortes trat ich in das Reform-Real-Gymnasium in Neutitschein ein, wo ich 1939 das Reifezeugnis erhielt. Noch im gleichen Jahre wurde ich zur Wehrmacht einberufen. Während des Krieges diente ich bei der Artillerie und Infanterie und nahm am Frankreich- und Rußlandfeldzug teil. Im April 1943 wurde ich zum Offizier befördert. Bei der Abwehrschlacht um Aachen geriet ich 1945 in englische Kriegsgefangenschaft, aus der ich 1948 zu meinen nach Württemberg ausgesiedelten Eltern entlassen wurde. Zum Sommersemester 1949 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen. Im April 1950 heiratete ich die Gewerbeoberlehrerin Judith Blaschke aus Zauchtel. Im Frühjahr 1951 legte ich die tierärztliche Vorprüfung ab und im Wintersemester 1953/54 die tierärztliche Prüfung. Nach Ableistung meiner Praktikantenzeit bei Herrn Tierarzt Dr. Egon Füsler in Fulda erhielt ich die Approbation.

